



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO ANTIOXIDANTE Y HEPATOPROTECTOR
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Hippocratea
excelsa* KUNTH SOBRE EL SÍNDROME
METABÓLICO.**

T E S I S

Para obtener el título de:

B I Ó L O G O

PRESENTA

OSCAR CRÍSTOBAL VILLAFUERTE ANAYA

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. ELIZABETH ALEJANDRINA GÚZMAN
HERNÁNDEZ**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme la oportunidad de crecer académicamente y personalmente.

A todos los profesores que me brindaron sus conocimientos y experiencias.

A mi asesora la Dra. Elizabeth Alejandrina Guzmán Hernández, por su dedicación, tiempo, conocimiento y ayuda para realizar el siguiente trabajo. Me llevo muchas anécdotas y espero que logre todos sus objetivos a futuro en todos los aspectos.

A mis sinodales: Dra. Rocío Serrano Parrales, Dr. Martín Palomar Morales, Mtro. David Segura Cobos y Mtra. Marisol Ávila Romero; por sus aportes al presente trabajo, por el tiempo que me dedicaron y por la ayuda que recibí de cada uno de Uds.

A Silvana, por ser una muy buena compañera de laboratorio. Todo el apoyo que demostraste desde que aparecí un día de la nada y hacer mucho más amena y divertida la estadía, siempre estará presente.

A Carolina, por ser una gran amiga a lo largo de la carrera. Disfrutamos de muchas vivencias buenas y malas, en cuestión académica y personal. Por todos tus regaños y consejos, pero sobre todo por enseñarme a ser una mejor persona. Espero que logres tus sueños y anhelos..... Sabes lo importante que fuiste, eres y serás en mi vida..... Simplemente gracias.

A Quique, hiciste de la última parte de esta travesía muy relajada; consejos que nunca llevamos a cabo, tonterías, muchos ratos agradables. El camino apenas empieza, pero sé que, aunque nos falte tiempo una buena platica y una cerveza siempre estará disponible.

A todos mis compañeros que formaron parte de esta odisea, siempre he sido de fácil palabra por lo tanto son un montón, pero a cada uno le agradezco todas y cada una de sus historias.

DEDICATORIAS

A mi mamá

Por ser una guía en todo momento, forjarme como persona con los valores adecuados y debidos. Por toda tu atención, cuidado y cariño; me has apoyado desde que tengo memoria y este trabajo es la conclusión de un acto de mi vida en la tuya.

A mi papá

Has sido el desarrollador de este proyecto, desde que me ayudabas a hacer la tarea en el kínder hasta el día de hoy. Siempre has confiado en mí y me has hecho sentir seguro, nunca ha sido necesario esconder algo porque nunca fue necesario, lo logramos.

A mi hermana

Llevamos la típica relación de hermanos "Amor-Odio" pero siempre has sido la pequeña y me has ganado. Espero que logres y cumplas tus metas, siempre te voy a apoyar.

A mis Abuelos

Por estar presentes y otorgarme consejos y anécdotas, en especial a mi abuelita por apoyarme en todas las cuestiones y ayudar en las medidas de sus posibilidades.

A Nadia

Nunca olvidaré el día que te conocí, cuando me atreví a hablarle a aquella chica de medicina tímida con un brillo radiante en su mirada, tuve la oportunidad de conocer a una niña muy berrinchuda y caprichosa, divertida, alegre, altruista, pero sobre todo demasiado tierna. Personalmente ha sido la mejor decisión que he realizado. Me apoyaste tanto desde aquel momento, siempre has tenido tiempo para escucharme cuando nadie más estaba. Hemos pasado tantos momentos buenos y malos, me has formado como persona, he visto como logras tus objetivos y en esta etapa universitaria eres la persona más importante. Siempre serás "la niña de mis ojos" Ale; mereces lo mejor de la vida, gracias por todo.

A Poncho

Solo una o dos veces la vida te presenta amigos que perdurarán para toda la vida y tú eres uno de ellos. De manera externa en el paso de todo este tiempo, cada rato ha sido ameno. Me has ayudado para distraerme un poco de todo el ámbito académico. Aún faltan muchas nuevas historias que contar...

"No todos los que andan sin rumbo fijo se pierden"

J.R.R. Tolkien.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|----------------------------------|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 11 |
| HIPOTESIS..... | 11 |
| OBJETIVOS..... | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| RESULTADOS..... | 17 |
| DISCUSIÓN..... | 36 |
| CONCLUSIONES..... | 44 |
| REFERENCIAS..... | 45 |
| ANEXOS..... | 53 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Criterios de diagnóstico para el síndrome metabólico..... | 3 |
| Tabla 2. Clasificación de antioxidantes por su origen..... | 5 |
| Tabla 3. Grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de <i>H. excelsa</i> | 17 |
| Tabla 4. Parámetros metabólicos iniciales..... | 23 |
| Tabla 5. Variables metabólicas a las 12 semanas de inducción del síndrome metabólico..... | 24 |
| Tabla 6. Variables metabólicas a las 18 semanas de inducción del síndrome metabólico..... | 25 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. <i>Hippocatea excelsa</i> Kunth..... | 10 |
| Figura 2. Cromatograma obtenido mediante CG-MS del extracto etanólico de <i>H. excelsa</i> | 18 |
| Figura 3. Curva patrón del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales... | 19 |
| Figura 4. Actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>H. excelsa</i> frente al radical ABTS ^{•+} | 20 |
| Figura 5. Actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>H. excelsa</i> frente al radical DPPH [•] | 21 |
| Figura 6. Curva patrón de Trolox con el reactivo FRAP..... | 22 |
| Figura 7. Valores promedio de triglicéridos en cada grupo experimental..... | 26 |
| Figura 8. Concentración plasmática de lipoproteínas en presencia de los diferentes tratamientos; A) Lipoproteínas de alta densidad; B) Lipoproteínas de baja densidad..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 9. A) Peso corporal (g) en presencia de los diferentes tratamientos, B) Peso del hígado (g) en presencia de los diferentes tratamientos..... | 28 |
| Figura 10. Relación peso hígado / peso corporal. *Estadísticamente significativo comparado con el grupo control; & Estadísticamente significativo comparado con el grupo de fructosa ($p<0.05$)..... | 29 |
| Figura 11. Concentración plasmática de aminotransferasas en presencia de los diferentes tratamientos. A) Aminotransferasa Alanina, B) Aminotransferasa Aspartato..... | 30 |
| Figura 12. Actividad antioxidante de la enzima catalasa en el homogeneizado de hígado en presencia de los diferentes tratamientos..... | 32 |
| Figura 13. Actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en el homogeneizado de hígado en presencia de los diferentes tratamientos..... | 33 |
| Figura 14. Actividad antioxidante de la enzima glutatión peroxidasa en el homogeneizado de hígado en presencia de los diferentes tratamientos..... | 33 |
| Figura 15. Cortes histológicos sagitales de tejido hepático a 400X de los diferentes tratamientos..... | 35 |

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) de manera general es el conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central, dislipidemia, hipertensión arterial, hiperglucemia e inflamación. De manera local en el tejido hepático el SM altera la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs) por medio de los ácidos grasos de cadena libre presentes en el tejido adiposo que interactúa con el órgano y se puede llegar a desarrollar la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Una alternativa para el tratamiento del SM y de la EHGNA es el uso de plantas medicinales, en el presente trabajo se evaluó el efecto antioxidante del extracto etanólico de *Hippocratea excelsa* mediante pruebas *in vitro* frente al radical ABTS^{•+} CA₅₀= 21.73 µg/mL, CA₅₀=18.05 µg/mL con el radical DPPH[•] y 379.2 µg ET/g de extracto con el método FRAP y se elaboró un modelo animal experimental de ratas Wistar macho con SM inducido por fructosa al 20% añadido en el agua y comida, para demostrar los efectos del extracto etanólico de *H. excelsa*. Al término de la fase experimental, se observó un efecto anti-obesidad al disminuir el índice de Lee de 0.34 a 0.3, un efecto hipotensor al regular la presión arterial; un efecto hepatoprotector al evitar la hipertrofia del órgano, disminuyó la concentración de las aminotransferasas ALT, AST y las lipoproteínas de baja densidad y un efecto antioxidante *in vivo* al normalizar la actividad de las enzimas: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, restaurando la ultraestructura celular hepática. Los resultados permiten considerar al extracto etanólico de *H. excelsa* como una alternativa para el tratamiento del síndrome metabólico y la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es el conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central (acumulación de grasa en el tórax y abdomen principalmente), la disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumento de la presión arterial, hiperglucemia, inflamación y el aumento de la concentración de triglicéridos. La Federación Internacional de Diabetes propone que para poder llevar a cabo el diagnóstico del SM es necesario que el paciente presente tres de los cinco factores previamente mencionados (Zimmet *et al.*, 2005). En comparación, algunas otras instituciones determinan el diagnóstico del SM con algunos otros factores los cuales fueron resumidos por Fernández (2016) y se presentan en la tabla 1.

La prevalencia del SM se ha incrementado rápidamente alrededor del mundo no solo en países industrializados también en los países en vías de desarrollo debido al incremento en la ingesta de alimentos de las personas y la vida sedentaria (Otani, 2011).

México ocupa el lugar número uno a nivel mundial en obesidad; en donde su población al subdividirla en 4 rangos refleja que el 9.8% de los preescolares presentó sobrepeso, 33.2% de los niños en edad escolar también presentó sobrepeso, 36.3% de los adolescentes, el 72.5% de los adultos padece sobrepeso u obesidad y la prevalencia de obesidad abdominal en esta parte de la población es del 76.6% (Hernández *et al.*, 2016). Esta enfermedad es el principal precursor del síndrome metabólico (SM) el cual se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI.

Tabla 1. Resumen de los criterios diagnósticos del síndrome metabólico

| Criterios diagnósticos | OMS | EGIR | IDF | NCEP-ATP III |
|---------------------------------|--|--|---|---|
| Resistencia a la insulina | Disminución de la captación de glucosa en condiciones euglicémicas, con hiperinsulinemia | Insulinemia >25% de los valores en ayunas en no diabéticos | No lo considera | No lo considera |
| Glicemia en ayunas (mmol/L) | ≥ 6,1 | ≥ 6,1 | ≥ 5,6 | ≥ 5,6 |
| PTG (mmol/L) | ≥ 7,8 | No lo considera | No lo considera | Alterada previamente |
| Diabetes mellitus | Diagnóstico previo | No lo considera | Diagnóstico previo | Diagnóstico previo |
| Triglicéridos (mmol/L) | ≥ 1,695 | ≥ 2,00 o tratamiento | ≥ 1,70 o tratamiento | ≥ 1,70 o tratamiento |
| HDL-C (mmol/L) | M ≤ 0,9 F ≤ 1,0 | < 1,0 o tratamiento | M < 1,04, F < 1,29 o tratamiento | M < 1,04, F < 1,29 o tratamiento |
| Presión arterial (mmHg) | ≥ 140/90 | ≥ 140/90 o diagnóstico previo de hipertenso | ≥ 130/85 o diagnóstico previo de hipertenso | ≥ 130/85 o diagnóstico previo de hipertenso |
| Diámetro cintura abdominal (cm) | M > 90 F > 85 | M ≥ 94 F ≥ 80 | Variable según grupo étnico | M > 102 F > 88 |
| IMC (kg/m ²) | > 30 | No lo considera | No lo considera | No lo considera |

OMS: Organización Mundial de la Salud, EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina, IDF: Federación Internacional de Diabetes, NCEP-ATP III: Tercer Reporte del Programa de Educación sobre el Colesterol, el Panel de Expertos en Diagnóstico, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos M-sexo masculino; F-sexo femenino; HDL-C: colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad; IMC-índice de masa corporal; Tratamiento-se refiere a presentar valores normales de los lípidos en el momento del estudio pero está bajo tratamiento por diagnóstico previo.

(Tabla tomada de Fernández, 2016).

Un paciente diagnosticado con el SM es altamente propenso a desarrollar la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA), la cual se caracteriza por la presencia de depósitos de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos en forma de vacuolas de tipo micro vesicular; la acumulación excesiva de componentes lipídicos y la nula adaptación del hepatocito a ellos producen inflamación celular y fibrosis, causando la muerte celular de los hepatocitos por necrosis o apoptosis (Brea *et al.*, 2017). Aunque en una fase previa de la EHGNA se presenta una alta concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs) en todo el organismo, pero principalmente en el hígado (Buqué, *et al.*, 2008).

Los radicales libres son átomos, iones o moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. No obstante, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, y de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis.

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies precursoras que no se consideran radicales, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes pro oxidantes y son las EROs las principales son: Radical hidroxilo (HO^{\bullet}), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Anión superóxido (O_2^-), Óxido nítrico (NO) y el Peróxido (roo). Las EROs se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa. Algunas circunstancias que también producen EROs en el organismo son:

dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia y reperfusión, así como el ejercicio extenuante (Venereo, 2002).

Las concentraciones elevadas de las EROs producen daño celular, como respuesta a esto, las células cuentan con mecanismos de defensa conocidos como sistemas antioxidantes. De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes se recomienda adoptar la que los divide por su origen (Rodríguez *et al.*, 2001). Y de acuerdo con Venereo, en el 2002, se clasifican como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de antioxidantes por su origen.

| Origen | Acción |
|---|---|
| 1. Exogenos | |
| Vitamina E | Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres de hidroxilo, captura O ₂ y neutraliza peróxidos. |
| Vitamina C | Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres de hidroxilo, captura O ₂ y regenera la forma oxidada de la vitamina E. |
| Betacarotenos Flavonoides, Licopenos | Neutralizan el oxígeno singlete. |
| 2. Endogenos | |
| Enzimáticos | Cofactor |
| Superóxido dismutasa (SOD) | Cobre, sodio, manganeso. |
| Catalasa (CAT) | Hierro |
| Glutatión peroxidasa (GPx) | Selenio |
| 3. No enzimáticos | |
| Glutatión | Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células. |
| Coenzima Q Ácido tioctico | Transportadora de metales (Transferrina y ceruloplasma). |

Las EROs inducen a la activación de citosinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas como la 6 (IL 6) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); causando inflamación, resistencia a la insulina y fibrosis hepática (Barraza y Stalnikowitz, 2013).

La EHGNA causa a nivel local una mayor producción de EROs derivadas del aumento significativo del estrés oxidativo el cual produce inflamación, alteración en los niveles de lipoproteínas y en una última instancia esteatosis hepática no alcohólica (Akhlaghi, 2016).

Las lipoproteínas tienen la función de transportar lípidos a través de la sangre principalmente el colesterol no esterificado, el colesterol esterificado, triglicéridos y los fosfolípidos. Se clasifican por su densidad la cual determina su tamaño, así las lipoproteínas menos densas son las más grandes y con mayor contenido de lípidos. De mayor a menor tamaño están los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de densidad intermedia y las lipoproteínas de alta densidad (respectivamente VLDL, LDL, IDL y HDL por sus siglas en inglés) (Errico *et al.*, 2013). Pero al existir una elevada concentración de las VLDL en el organismo derivado de la alteración en su producción por las EROs estas lipoproteínas al pasar por el torrente sanguíneo en grandes cantidades elevan los niveles de triglicéridos, lo que causa hipertensión arterial y en una fase aguda arterosclerosis (Hernández *et al.*, 2011).

Los antioxidantes han sido sugeridos como agentes prometedores para el tratamiento de la EHGNA ya que estos se encuentran disminuidos en dicha patología y tienen la capacidad de atenuar el daño causado por la obesidad en el paciente (Akhlaghi, 2016).

El tratamiento farmacológico del SM y para atenuar la EHGNA consiste en la aplicación de diferentes fármacos para cada una de las patologías por separado. Para el control de la obesidad se emplean fármacos como la Sibutramina y el Orlistat, en el caso de la hiperglucemia se administra la Metformina principalmente, para la presión arterial se utilizan los antagonistas de los receptores de la

angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y beta bloqueadores, por último, para la trigliceridemia se utilizan las estatinas (Domínguez *et al.*, 2013). No se ha definido un tratamiento farmacológico específico para un paciente que haya desarrollado esteatosis hepática no alcohólica, solamente se les recomienda seguir el tratamiento indicado para el SM (Rovira *et al.*, 2008).

La sibutramina actúa a nivel central en el hipotálamo, bloqueando la recaptación de serotonina y noradrenalina produciendo un pequeño efecto termogénico y un efecto anorexígeno el cual induce una pérdida de peso por reducción global de la ingesta. Por su parte el orlistat actúa de manera local en el intestino delgado sobre la lipasa pancreática e inhibe de forma selectiva la absorción de grasa alimentaria, así induce una pérdida de peso por disminución de la grasa corporal (El Ferrol y Coruña, 2006). La metformina tiene efecto antihiper glucemiante a través de acciones extra pancreáticas. Su principal mecanismo de acción es el aumento de la sensibilidad a la insulina en tejido hepático: disminución de la glucogenólisis (liberación hepática de glucosa) y neoglucogénesis (formación de glucosa a partir de otros sustratos como aminoácidos o glicerol). También aumenta la sensibilidad a la insulina en tejido periférico (principalmente en músculo) (Crespo, 2009). Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina tienen un efecto inhibitor en la conversión de angiotensina I a angiotensina II; también impiden la desactivación de la bradiquinina, un potente vasodilatador. Interfieren con la interacción de la angiotensina II con la norepinefrina y con la prostaciclina tisular local. Reducen la formación de angiotensina III, la cual estimula la corteza suprarrenal para producir aldosterona, reduciendo así la concentración plasmática de sodio (García, 1996). Por último, las estatinas disminuyen la síntesis endógena de colesterol mediante inhibición competitiva de la enzima hidroximetil glutaril coenzima A reductasa, enzima limitante en la biosíntesis del colesterol. Ocupan una porción del receptor bloqueando la unión del sustrato al lugar de la actividad enzimática (Ceballos *et al.*, 2008).

Esté conjunto de fármacos desencadena una alta serie de efectos secundarios en el organismo del paciente como ansiedad, desequilibrio metabólico, déficit de vitaminas liposolubles, heces grasas, taquicardia y excitabilidad, por mencionar solamente algunos (Benito *et al.*, 2005). Por lo que lleva a que en algunas ocasiones el paciente abandone su tratamiento y recurra a otras alternativas de tratamiento, como el uso de las plantas medicinales.

En México la medicina tradicional es utilizada principalmente en zonas rurales para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud, evitando los efectos secundarios provocados por los diferentes tratamientos farmacológicos (Meckes *et al.*, 2004). Actualmente en el país se encuentra establecida a nivel institucional la dirección de medicina tradicional y desarrollo intercultural; la cual tiene como objetivo principal difundir, promover y aplicar los conocimientos sobre salud y la enfermedad que los diferentes pueblos indígenas han acumulado a través de su historia. Mediante la iniciativa de la creación de hospitales integrales los cuales están encargados de proporcionar el tratamiento adecuado para las principales patologías que afronta la población mexicana primordialmente con los conocimientos de la región en la que se encuentren y recopilando información de las comunidades aledañas, las personas que se encargan de esta labor ya tienen un término definido, el cual consiste en ser un terapeuta tradicional (SSA, 2013).

Para el tratamiento del SM se han estudiado diferentes plantas, por ejemplo: los extractos del comino negro (*Nigella sativa*), el ajo (*Allium sativum*), tamarindo (*Tamarindus indica*), azafrán (*Crocus sativus*) (Fadlalla Eman- khojah Ebtijal, 2017) y la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), lograron atenuar los padecimientos del SM (Ajiboye *et al.*, 2015).

En el caso de la EHGNA los estudios de las plantas con efecto hepatoprotector son más generales y algunas que presentan esa característica son: el extracto del perejil (*Petroselinum sativum*) (Troncoso-Guija, 2007), la semilla de salvia (*Salvia hispánica L.*) (Rossi *et al.*, 2011), albahaca (*Ocimum basilicum*), el ajo (*Allium sativum*) (Bermúdez *et al.*, 2014) y el mortiño (*Vaccinium floribundum*) (Medina *et al.*, 2017).

Una planta medicinal comúnmente utilizada en el país es *Hippocratea excelsa* Kunth “Cancerina” (Figura 1), perteneciente a la clase Equisetopsida del orden Celestrales y a la familia Celestraceae. Es un árbol bajo con ramas patentes el cual puede alcanzar hasta ocho metros de alto, sus hojas son de forma elíptico-oblongas y su ápice redondeado u obtuso. Su distribución abarca desde el sureste de México hasta Panamá (Jiménez, 2011). Principalmente se ocupa la corteza, para el tratamiento de enfermedades de la piel, úlceras gástricas y por sus propiedades como un pesticida, sin embargo, no ha sido ampliamente estudiada (Mata *et al.*, 1990).

En 2002 Navarrete y colaboradores aislaron las fracciones activas del extracto etanólico de la corteza de la raíz de *H. excelsa* obteniendo principalmente sitosterol-3-O- β -glucósido, β -sitosterol y (-) epicatequina probando una actividad gastro protectora en modelos animales.

Pérez y colaboradores, en 1995, reportaron actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de la corteza de *H. excelsa* encontrando que el extracto tiene un efecto protector sobre la lisis de los eritrocitos y de la fase exudativa.

Mena y colaboradores, en el 2007, describieron dos nuevos triterpenos obtenidos del extracto de la corteza de *H. excelsa* el primero es 21 β -hydroxyolean-12-en-3-one y al segundo lo nombraron dzununcanone. Realizaron actividad antiprotozoaria de ambos compuestos obteniendo una actividad elevada en contra del protozoario *Giardia lamblia*.

Cáceres y colaboradores, en el 2008, aislaron los compuestos de la corteza de *H. excelsa*, obtuvieron seis triterpenos pentacíclicos, cinco oleanaceos y ursano. Posteriormente sometieron los cinco compuestos oleanaceos a pruebas anti-giardiales obteniendo resultados negativos.

Los trabajos que se mencionan anteriormente hasta el momento de esta revisión para la planta *H. excelsa* son los únicos relacionados con algún uso farmacológico y de algunos de los compuestos fitoquímicos presentes de dicho ejemplar.



a)



b)



c)

Figura 1. *Hippocatea excelsa* Kunth. a) Hojas de *H. excelsa*, b) Corteza de *H. excelsa*, c) Corteza de *H. excelsa*. (Imágenes tomadas de: plantasdemexico.blogspot.mx)

JUSTIFICACIÓN

En México las plantas medicinales actualmente son utilizadas por la alternativa que brindan por sus metabolitos secundarios activos que contienen y se evita el uso de fármacos que en tratamientos de larga duración ocasionan severos efectos secundarios. En el caso del SM y la EHGNA su tratamiento farmacológico consta de numerosos fármacos y un paciente diagnosticado con la patología es muy propenso a abandonar su tratamiento. Por lo tanto, se buscan nuevos blancos terapéuticos que tengan efectos en más de una de las manifestaciones clínicas con la finalidad de crear un nuevo fármaco. Se ha llevado a cabo la búsqueda de una planta que podría ser utilizada para el tratamiento del SM y presentará algún efecto hepatoprotector, está se eligió de acuerdo con: a) que no tenga estudios previos para las patologías anteriormente mencionadas b) que en los antecedentes se muestren pruebas de algún efecto farmacológico y la descripción de algunos compuestos fitoquímicos que sean potencialmente funcionales. La planta que será utilizada en este estudio es *H. excelsa*.

HIPÓTESIS

La administración repetida por vía oral de los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de la corteza de *H. excelsa* en ratas Wistar con SM inducido por fructosa, disminuirá el daño hepático y las manifestaciones clínicas del SM.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antioxidante y hepatoprotector del extracto etanólico de *H. excelsa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *H. excelsa*.
- Determinar el efecto antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de *H. excelsa*.
- Medir la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en el hígado de ratas con SM en presencia de los diferentes tratamientos.
- Determinar la actividad de las aminotransferasas como indicadores de la función del hígado, en ratas con SM y bajo los diferentes tratamientos.
- Detectar histológicamente el daño hepático en presencia de los diferentes tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y obtención del extracto etanólico de *H. excelsa*

Se llevó a cabo la identificación de *H. excelsa* en el herbario IZTA de la FES-Iztacala, posteriormente se obtuvieron 3 kg de la corteza seca de la planta en el “Mercado de Sonora” ubicado en la colonia Merced Balbuena perteneciente a la delegación Venustiano Carranza de la Ciudad de México. La obtención del extracto etanólico se realizó mediante el método de maceración (Domínguez, 1973) (Anexo A).

Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *H. excelsa*

Se realizaron las pruebas correspondientes para la determinación de la presencia o ausencia de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides - Dragendorff y Mayer; saponinas - prueba de la espuma; terpenos – vainillina + H₂SO₄; glicósidos - prueba de Molisch (α -naftol + HCl); fenoles - cloruro férrico; cumarinas-(NaOH al 10%+ HCl al 10%);triterpenos - prueba de Lieberman.

Identificación de los compuestos del extracto etanólico de *H. excelsa* mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS por sus siglas en inglés)

El perfil del HPLC-MS del extracto se llevó a cabo en el laboratorio nacional en salud: diagnóstico molecular y efecto ambiental en enfermedades crónico-degenerativas de la FES-Iztacala, usando un instrumento Agilent G6230B acoplado con un espectrómetro de masas como detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se utilizó una columna capilar SE 30 (30 m x 0,2 mm; Agilent Technologies) para el análisis. La temperatura fue de 250 °C. Se inyectó una muestra de 20 μ l en modo dividido (90:10). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a una velocidad de flujo de 0,2 mL min⁻¹ y el tiempo total de funcionamiento fue de 60 minutos. La identificación de los fitocomponentes se realizó mediante comparación con los estándares publicados por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología.

Análisis *in vitro* del efecto antioxidante del extracto etanólico de *H. excelsa*

El extracto etanólico se sometió a las siguientes pruebas con la finalidad de determinar su efecto antioxidante y concentración de fenoles totales.

- a) Reacción de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) (Anexo B).
- b) Reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolin-6 sulfonato de amonio [ABTS^{•+}]) (Método modificado de Re *et al.*, 1999) (Anexo C).

c) Reacción del radical 2,2-difenil-picril-hidracilo (DPPH*) (Método modificado de Murillo, 2006) (Anexo D).

d) Poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) (Método modificado de Benzie y Strain, 1996) (Anexo E).

Modelo animal experimental

Se utilizaron 25 ratas macho cepa Wistar las cuales fueron proporcionadas por el bioterio FESI ubicado en las instalaciones de la FES-Iztacala. Los organismos se seleccionaron en su etapa adulta con un peso de 200-250g. Se mantuvieron en condiciones de temperatura entre 18°-26 °C, humedad ambiental del 30% al 70% y ciclos de luz y oscuridad 12:12. Siguiendo en todo momento las reglas establecidas en la NOM-062-ZOO-1999.

El establecimiento del SM en los grupos experimentales se logró dando la ingesta de un añadido del 20% de fructosa en el agua para beber y en la comida durante 12 semanas, a partir de la 13^a semana se empezó la aplicación de los tratamientos y tuvo una duración de seis semanas dando paso a la finalización de la fase experimental. Los grupos contaron con cinco ratas experimentales cada uno y estuvieron distribuidos de la siguiente manera:

Grupo control negativo: Se les suministró alimento (44.2% de carbohidratos, 18% proteína, 6.2% de grasa; 3.1kcal / g; Teklad Global dietas, HarlanLaboratories Inc., Indianapolis, IN, EE.UU.) y agua *ad libitum* durante las 18 semanas experimentales.

Grupo con Fructosa (control positivo): se les proporcionó un añadido de fructosa al 20% en el alimento y agua para beber durante las 18 semanas.

Grupo con Vitamina E 500mg/kg (+): se les suministró un añadido de fructosa al 20% en el alimento y agua para beber; de acuerdo con el peso de cada organismo, solamente las últimas 6 semanas del desarrollo experimental, en conjunto se les administró diariamente a las seis de la tarde vía oral con ayuda de una cánula la Vitamina E, la cual es de la marca Eternal.

Extracto etanólico 30 mg/kg: la porción extra del 20% de fructosa se mantuvo constante en el alimento y el agua para beber. Igualmente, en las seis semanas finales de la fase experimental, al mismo tiempo, diario a las 6:30 de la tarde se proporcionó el extracto oralmente, con ayuda de una cánula evitando que esté se derramara.

Extracto etanólico 100% mg/kg: también para este grupo a lo largo de las 18 semanas se mantuvo el 20% de fructosa en el alimento y el agua para beber. De acuerdo con el peso de cada individuo, se administró al mismo tiempo el tratamiento, a diario a las siete de la tarde durante las 6 semanas previas a concluir el desarrollo experimental. Mediante una cánula se evitó el desperdicio del mismo extracto.

Diagnóstico del síndrome metabólico y seguimiento

Para poder detectar la inducción del SM en los organismos experimentales se midieron a las 0 y 12 semanas los principales parámetros para cada patología y a las 18 semanas se volvieron a medir los mismos parámetros.

Obesidad: para llevar el seguimiento de la obesidad en las ratas se pesaron una vez a la semana durante el lapso de la fase experimental y se calculó el índice de Lee.

Parámetros bioquímicos en sangre (colesterol, glucosa y triglicéridos): para la determinación de las concentraciones plasmáticas de cada parámetro estás se obtuvieron mediante tiras reactivas al tiempo 0, 12 y a las 18 semanas con la utilización de un glucómetro Sensor Accutrend (Roche).

Presión arterial: la presión arterial sistólica se registró al inicio, a las 12 semanas y a las 18 semanas mediante la pletismografía no invasiva (Model LE; LeticaScientific Instruments, Barcelona, España) (Zhao *et al.*, 2011).

Parámetros bioquímicos en sangre

Se tomaron muestras de sangre en tubos heparinizados, las cuales fueron centrifugadas a 5000 g durante 15 minutos. Las muestras de plasma se separaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. La concentración plasmática de lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL) y la concentración de aminotransferasas ALT y AST, se determinaron mediante un Kit (Spinreact BEIS09-BEIS11), de acuerdo con los estándares proporcionados por el fabricante.

Determinación bioquímica del efecto antioxidante del extracto etanólico de *H. excelsa*

Se realizaron homogenizados del tejido hepático de cada grupo experimental y se sometieron a las siguientes reacciones enzimáticas antioxidantes para determinar su actividad.

- a) Catalasa (Método de Aebi. 1983) (Anexo F).
- b) Glutación peroxidasa (Método de Paglia y Valentine, 1967) (Anexo G).
- c) Superóxido dismutasa (Método de Beauchamp y Fridovich, 1971) (Anexo H).

Análisis histológico

Se extrajo el hígado de los organismos el cual se utilizó para el análisis histológico. El hígado fue colocado en una solución de formaldehído al 10% por 24 horas. La muestra del tejido se lavó con agua de la llave 4 veces por 15 minutos, posteriormente para la deshidratación del tejido se colocó en diferentes concentraciones de alcoholes: 70%, 80%, 90%, 96% y absoluto durante 60 minutos cada uno, posteriormente el tejido se incluyó en parafina, se realizaron cortes en el micrótopo marca GROSOR los cuales fueron colocados en portaobjetos y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (Anexo I).

Análisis estadístico.

Los datos recabados se analizaron en el programa Microsoft Excel 2016 con ANOVA simple y posteriormente se hizo una prueba post hoc de Tukey. La prueba se consideró significativa con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Identificación de la planta

La planta fue identificada en el Herbario "IZTA" de la FES Iztacala UNAM, como *H. excelsa* (HBK). El ejemplar de respaldo se integró a la colección científica con el número de registro IZTA2486.

Determinación de la composición química del extracto etanólico de *H. excelsa*

Pruebas cualitativas

Las pruebas cualitativas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios confirmaron la presencia de saponinas, terpenos y fenoles al dar un resultado positivo para cada una de las pruebas correspondientes (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *H. excelsa*.

| Grupo de metabolitos secundarios | Resultado |
|----------------------------------|-----------|
| Alcaloides | - |
| Saponinas | + |
| Terpenos | + |
| Glicósidos | - |
| Fenoles | + |
| Cumarinas | - |
| Triterpenos/Esteroides | + |

(+) Prueba positiva, (-) Prueba negativa

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) del extracto etanólico de *H. excelsa*

El análisis por HPLC realizado en el extracto etanólico de *H. excelsa* demostró la presencia de cinco compuestos; de los cuales tres fueron identificados mediante comparación con los estándares del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología. Los compuestos identificados son: la vainillina, la genisteína y el ácido oleanólico, que se muestran en la figura 2 en los tiempos de retención 9.28, 25.85 y 41.03 min. El ácido oleanólico fue el compuesto más abundante en la muestra, con 51.49%.

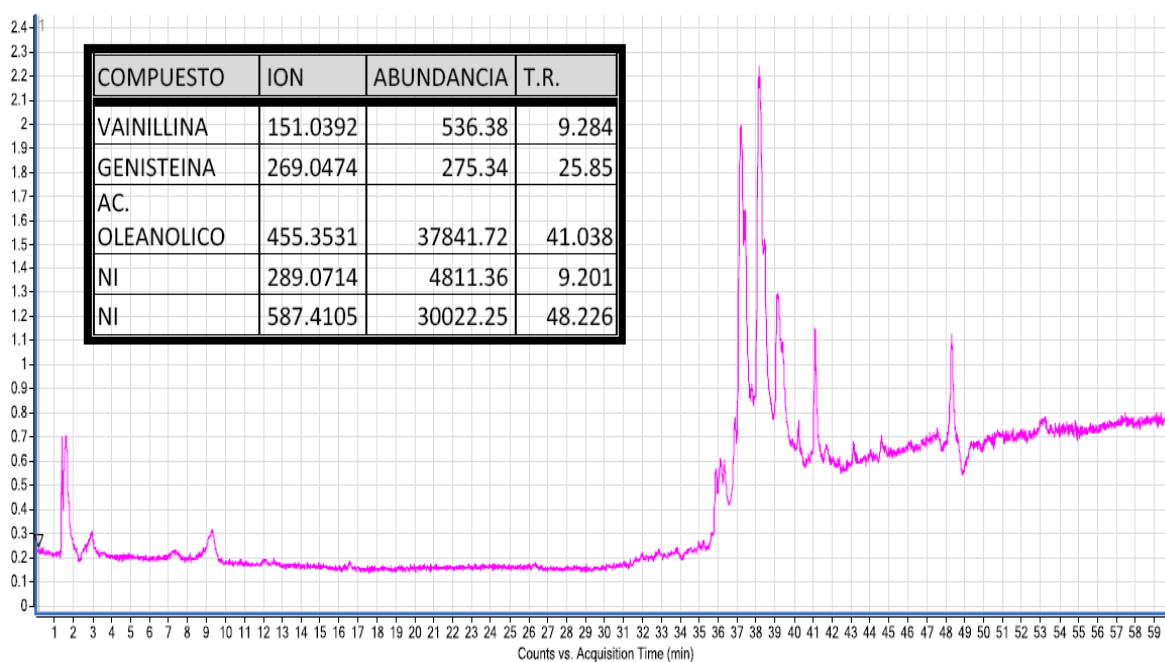


Figura 2. Cromatograma obtenido mediante HPLC del extracto etanólico de *H. excelsa*.

Cuantificación del contenido de fenoles totales

La determinación de los fenoles totales se llevó a cabo interpolando los valores obtenidos por el extracto etanólico en la curva patrón de ácido gálico (Figura 3), obteniendo un total de 286.4 mg EAG/g de extracto.

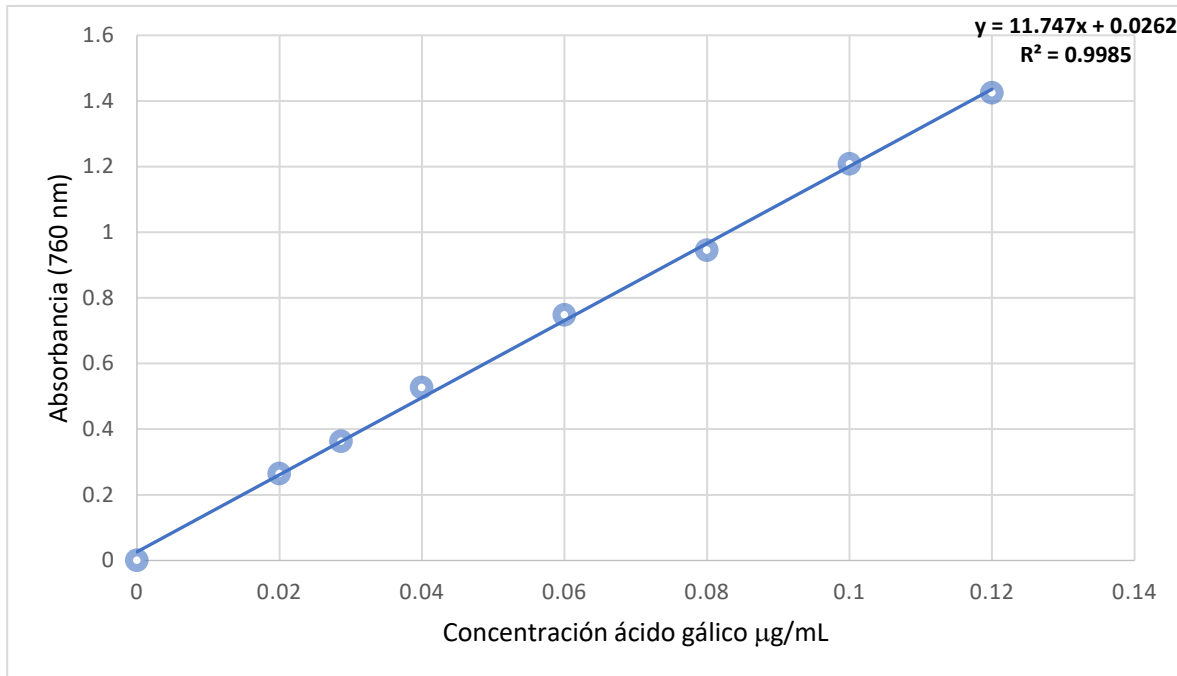


Figura 3. Curva patrón del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Análisis *in vitro* del efecto antioxidante del extracto etanólico de *H. excelsa***Método de reducción del radical ABTS^{•+}**

El extracto etanólico de *H. excelsa* presentó actividad antioxidante frente al radical ABTS^{•+}. En la concentración de 70 µg/mL el extracto redujo al radical en un 99%. Además, la CA₅₀ del extracto ante el radical fue de 21.73 µg/mL (Figura 4).

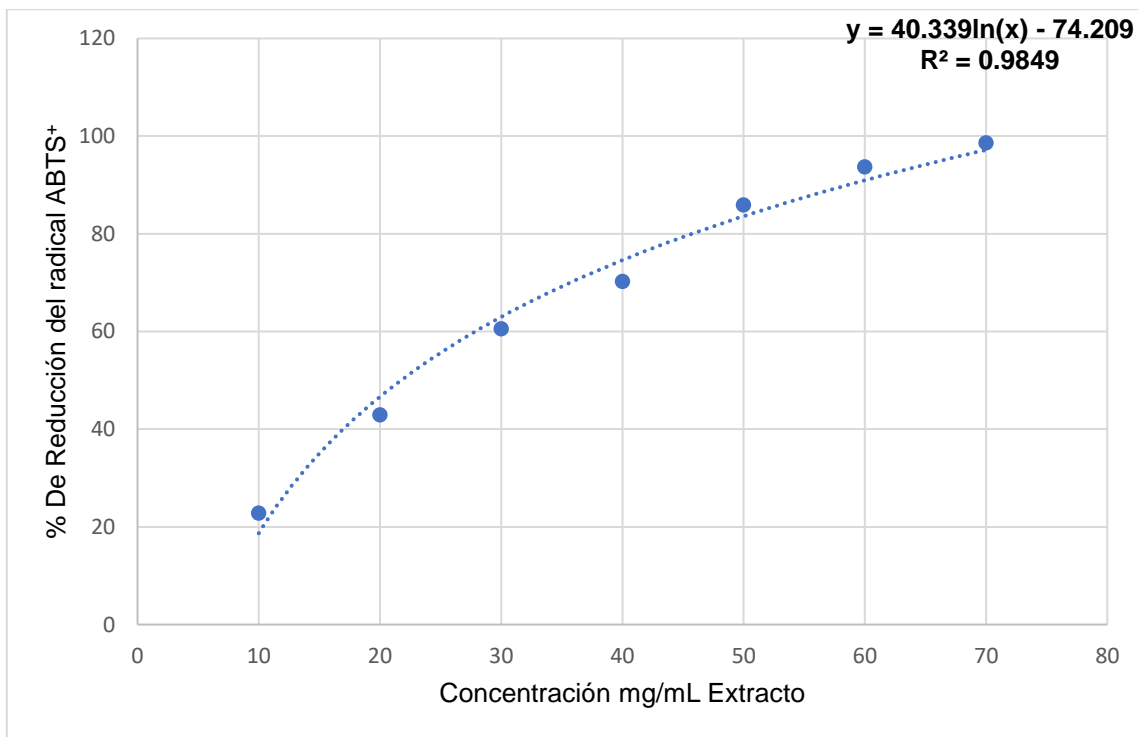


Figura 4. Actividad antioxidante del extracto etanólico de *H. excelsa* frente al radical ABTS^{•+}

Método de reducción del radical DPPH•

En la técnica realizada con el radical DPPH•, el extracto etanólico de *H. excelsa* también presentó actividad antioxidante, al reducir el radical 88% a partir de la concentración de 50 µg/mL (Figura 5). El extracto mostró una CA₅₀ de 18.05 µg/mL.

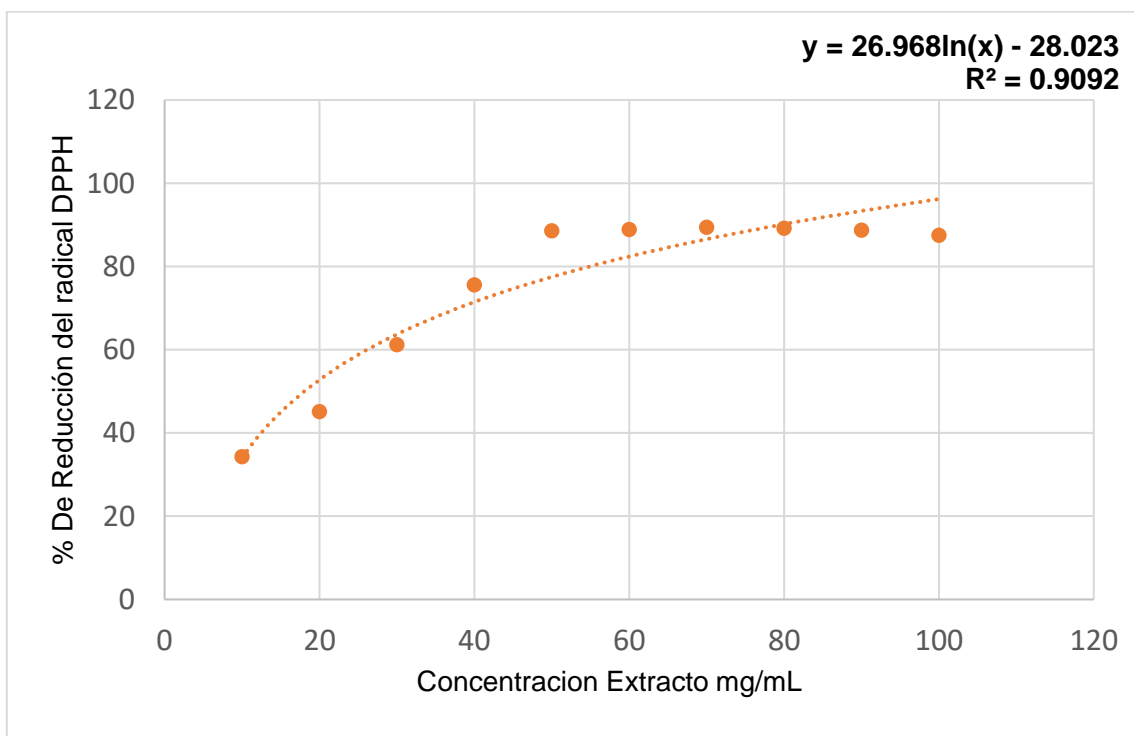


Figura 5. Actividad antioxidante del extracto etanólico de *H. excelsa* frente al radical DPPH•.

Método de capacidad antioxidante por reducción férrica (FRAP)

Por último, el extracto etanólico de *H. excelsa* tuvo actividad antioxidante en presencia del reactivo FRAP, reduciendo el hierro en estado férrico (Fe^{3+}) a un estado ferroso (Fe^{2+}). El extracto presentó un total de $379.2 \mu\text{g ET/g}$ de extracto, el cual se obtuvo de la interpolación de los valores obtenidos en la curva patrón de trolox, la cual se muestra en la figura 6.

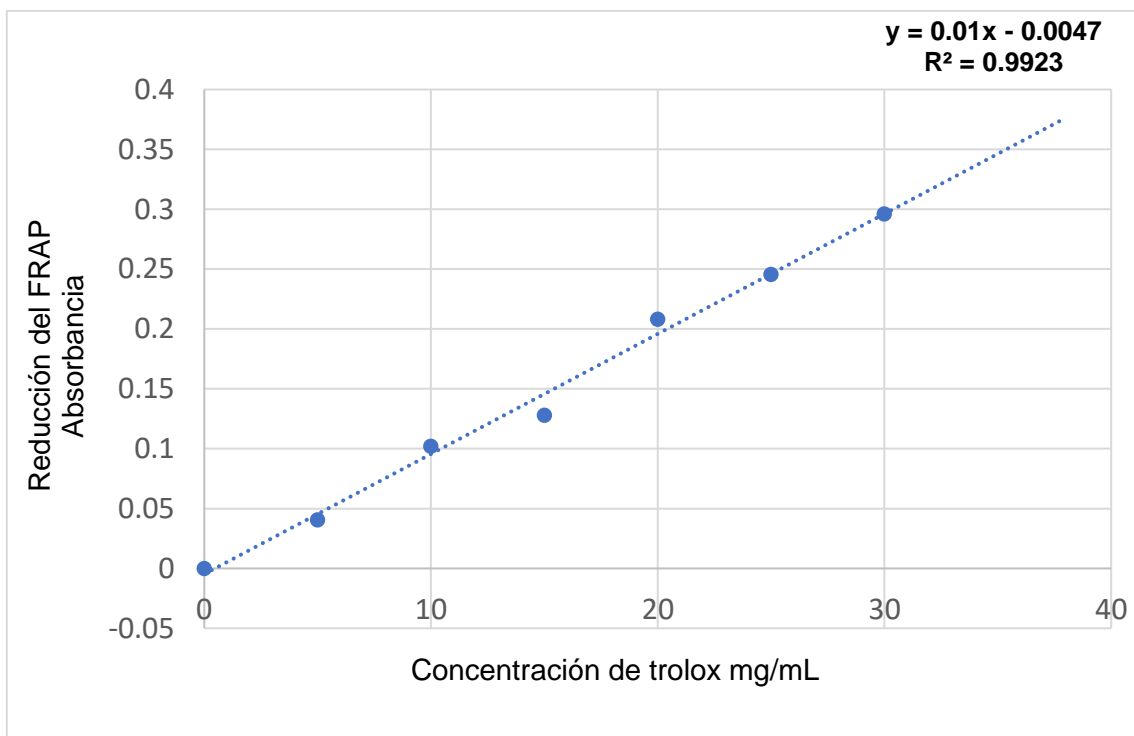


Figura 6. Curva patrón de Trolox con el reactivo FRAP.

Modelo animal experimental del Síndrome Metabólico.

Los organismos se escogieron aleatoriamente, posteriormente se midieron los parámetros mencionados en la tabla 4 para determinar si los organismos se encontraban en un estado de salud aceptable.

Tabla 4. Parámetros metabólicos iniciales.

| Variable | Grupo Control | Grupo Fructosa |
|--|----------------------|-----------------------|
| Peso corporal Inicial (g) | 231 ± 4.37 | 225 ± 2.99 |
| Índice de masa corporal (g/cm ²) | 0.77 ± 0.04 | 0.77 ± 0.08 |
| Circunferencia abdominal (cm) | 15.4 ± 0.4 | 14.76 ± 0.36 |
| Índice de Lee | 0.35 ± 0.01 | 0.36 ± 0.02 |
| Glucosa en plasma (mg/dL) | 85.2 ± 3.44 | 89.21 ± 5.83* |
| Triglicéridos en plasma (mg/dL) | Bajo | Bajo |
| Colesterol en plasma (mg/dL) | Bajo | Bajo |
| Presión arterial sistólica (mm Hg) | 111.8 ± 5.59 | 105.8 ± 6.91* |

Valores promedio ± ES (*n*= 5 para el grupo control y *n*= 20 para el grupo de fructosa)

*Estadísticamente significativo comparado con el grupo control; (*p*<0.05).

La tabla 5 muestra los resultados de los diferentes parámetros para determinar la presencia del SM después de administrar la dieta de fructosa añadida en agua y alimento al 20% durante 12 semanas. Hubo un aumento en el peso corporal, el índice de Lee, los triglicéridos, la presión arterial y la ingesta de agua y alimento ($p < 0.05$). Se determinó el diagnóstico del SM al presentar 3 de los 5 factores de riesgo entre los que se determinó la presencia de hipertrigliceridemia (239 mg/dL), obesidad (Índice de Lee > 0.3) e hipertensión arterial (Valor ≥ 140); lo cual dio paso a la última etapa del modelo experimental.

Tabla 5. Variables metabólicas a las 12 semanas de inducción del SM.

| Variable | Grupo Control | Grupo Fructosa |
|--|-----------------|------------------|
| Peso corporal 12 semanas (g) | 398 \pm 19 | 436 \pm 10 * |
| Ganancia de peso corporal (%) | 72.29% | 93.77% |
| Índice de masa corporal (g/cm ²) | 0.89 \pm 0.04 | 0.88 \pm 0.05 |
| Circunferencia abdominal (cm) | 17 \pm 0.58 | 22 \pm 0.085 |
| Índice de Lee | 0.28 \pm 0.01 | 0.34 \pm 0.01* |
| Glucosa en plasma (mg/dL) | 82 \pm 4 | 88 \pm 2 |
| Triglicéridos en plasma (mg/dL) | 82 \pm 4 | 239 \pm 18 * |
| Colesterol en plasma (mg/dL) | 100 \pm 4 | 136 \pm 15 |
| Ingesta de alimento (g/día) | 20 \pm 2 | 48 \pm 3 * |
| Ingesta de agua (mL/día) | 35 \pm 9 | 79 \pm 13 * |
| Presión arterial sistólica (mm Hg) | 116 \pm 15 | 140 \pm 5 * |

Valores promedio \pm EEM ($n = 5$ para el grupo control y $n = 20$ para el grupo de fructosa).

*Estadísticamente significativo comparado con el grupo control; ($p < 0.05$).

Al finalizar la fase experimental, después de dar seis semanas los tratamientos correspondientes se cuantificaron los parámetros correspondientes del SM como se observa en la tabla 6 y de manera gráfica se analizaron a detalle algunos de ellos.

Tabla 6. Variables metabólicas a las 18 semanas de inducción del SM.

| Variable | Control | Fructosa | Vit E | Ext 30 | Ext 100 |
|------------------------------------|-------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Ingesta de alimento (g/día) | 42 ± 4 | 14 ± 5* | 15 ± 4* | 16 ± 4* | 18 ± 4* |
| Ingesta de agua (mL/día) | 42 ± 4 | 70 ± 5* | 87 ± 8*& | 69 ± 9* | 76 ± 10*& |
| Índice de Lee | 0.31 ± 0.01 | 0.36 ± 0.02* | 0.30 ± 0.008& | 0.30 ± 0.003& | 0.30 ± 0.014& |
| Glucosa en plasma (mg/dL) | 80 ± 5 | 90 ± 4 | 91 ± 3 | 91 ± 2 | 96 ± 4 |
| Colesterol en plasma (mg/dL) | 100 | 121 ± 10* | 112 ± 9& | 139 ± 13* | 138 ± 11* |
| Presión arterial sistólica (mm Hg) | 110 ± 3 | 145 ± 4* | 125 ± 2& | 118 ± 4& | 117 ± 1& |

Valores promedio ± EEM ($n= 5$ para cada grupo experimental). * Estadísticamente significativo comparado con el grupo control; & Estadísticamente significativo comparado con el grupo de fructosa ($p<0.05$).

Los parámetros de obesidad (Índice de Lee) y presión arterial después del tratamiento con las dos concentraciones del extracto etanólico de *H. excelsa* regresaron a valores normales. Para el caso de los triglicéridos los resultados se mantuvieron elevados (figura 7), por lo cual se dio paso a la elaboración de un perfil lipídico el cual se muestra en la figura 8.

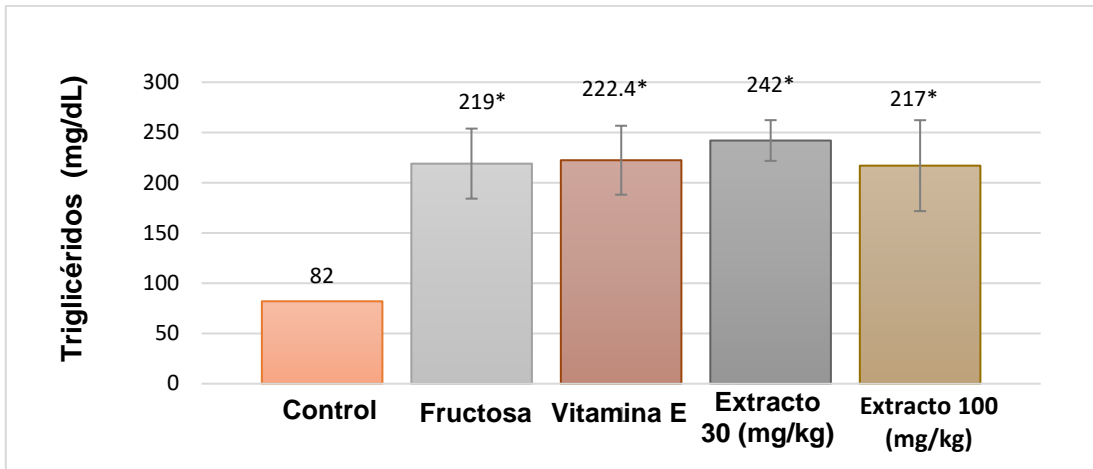
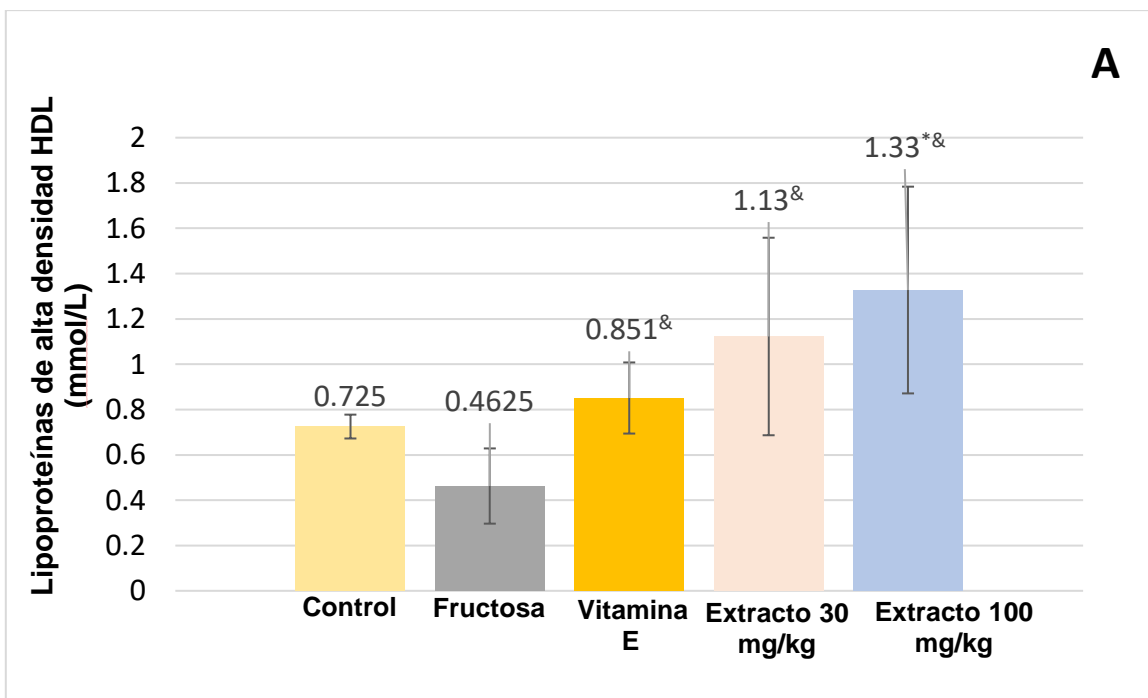


Figura 7. Valores promedio de triglicéridos en cada grupo experimental; Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.



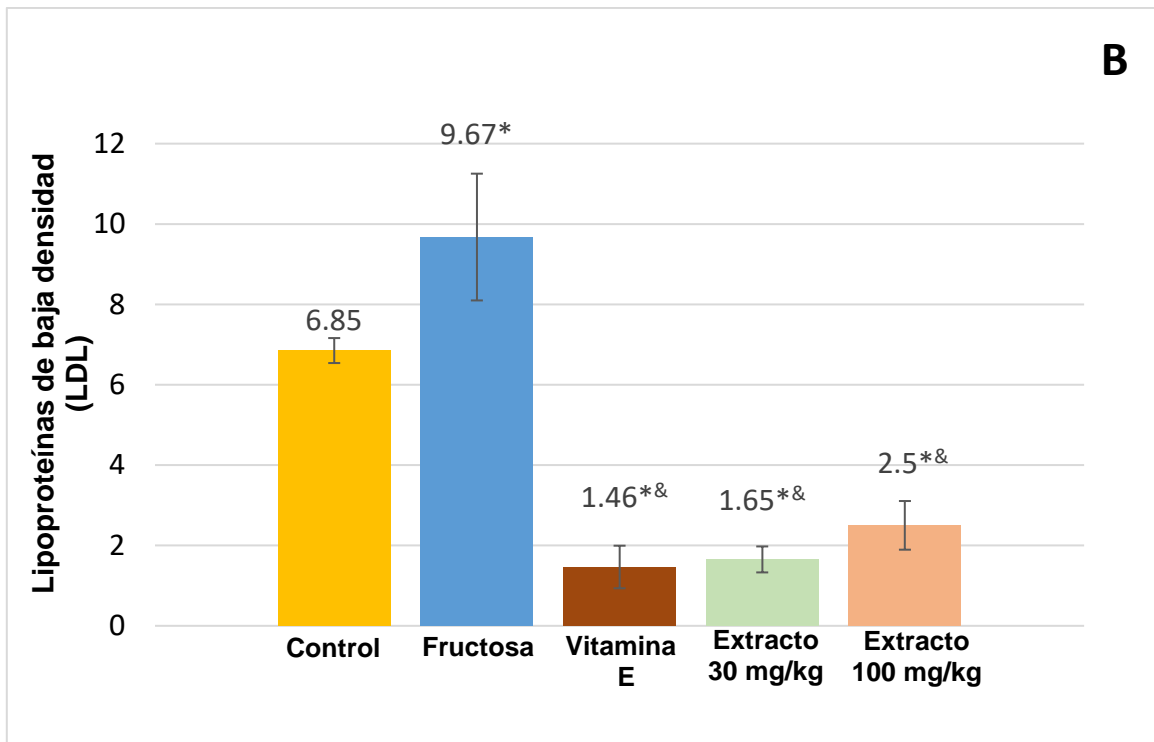


Figura 8. Concentración plasmática de lipoproteínas en presencia de los diferentes tratamientos; A) lipoproteínas de alta densidad; B) lipoproteínas de baja densidad. Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos

Al desglosar la proporción de lipoproteínas de alta y baja densidad, se puede observar que en el caso del grupo de fructosa la concentración de HDL está disminuida ya que se recomienda tener una concentración superior a 1.5 mmol/L y en contraparte la concentración de LDL está elevada teniendo como referencia el valor máximo permitido que es 2.6 mmol/L por lo cual se podría detectar el mal funcionamiento del tejido hepático. El tratamiento con ambas concentraciones del extracto etanólico de *H. excelsa* logró disminuir a valores aceptables las concentraciones de LDL, pero no pudieron alcanzar valores óptimos de HDL sin embargo si mostraron diferencias significativas en relación con el grupo tratado con fructosa. A continuación, se presenta en las figuras 9 (A y B) y 10 el peso corporal de los animales, el peso del hígado y la relación peso corporal/ peso del hígado respectivamente.

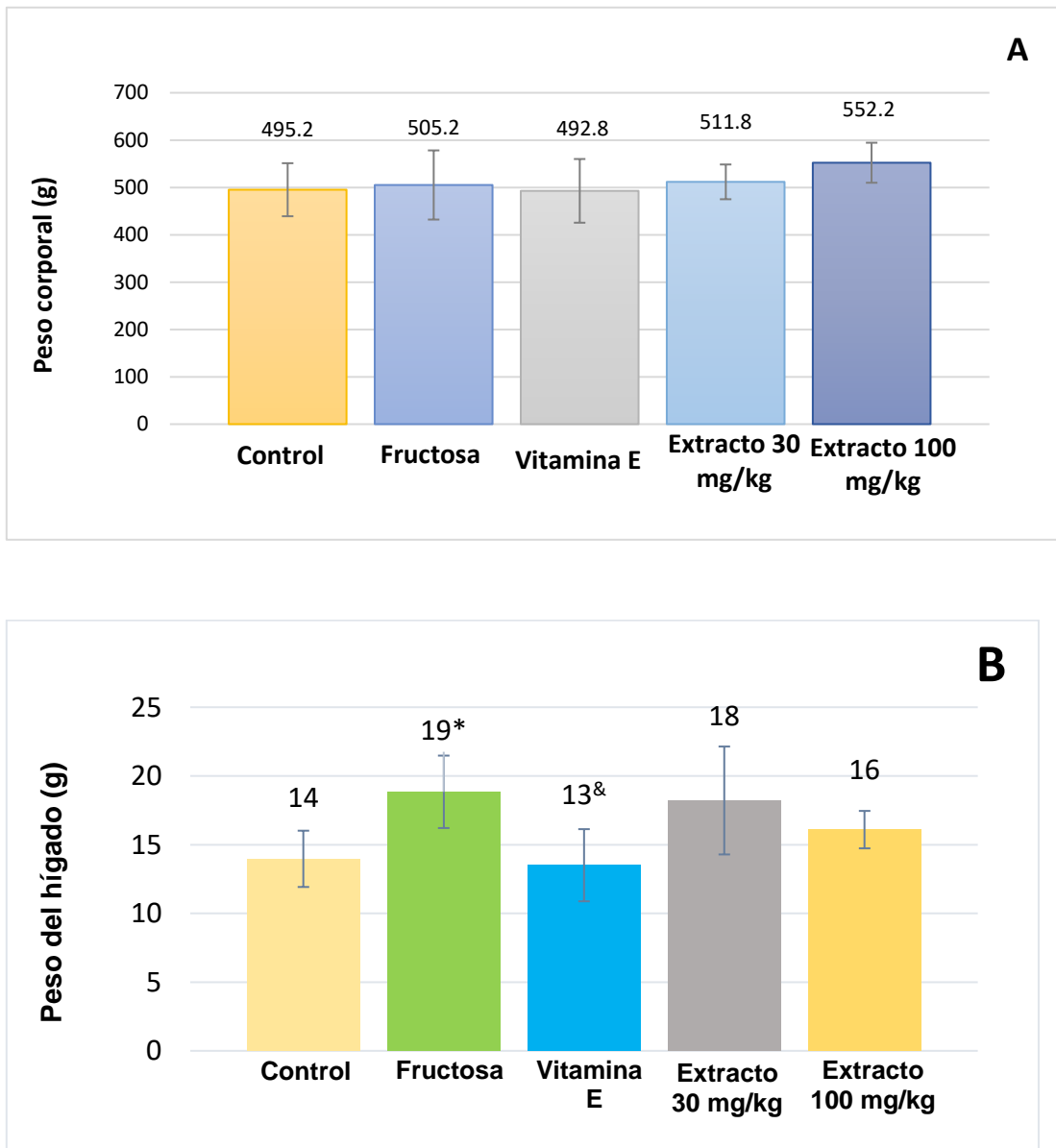


Figura 9. A) Peso corporal (g) en respuesta a los diferentes tratamientos, B) peso del hígado (g) en respuesta a los diferentes tratamientos. Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.

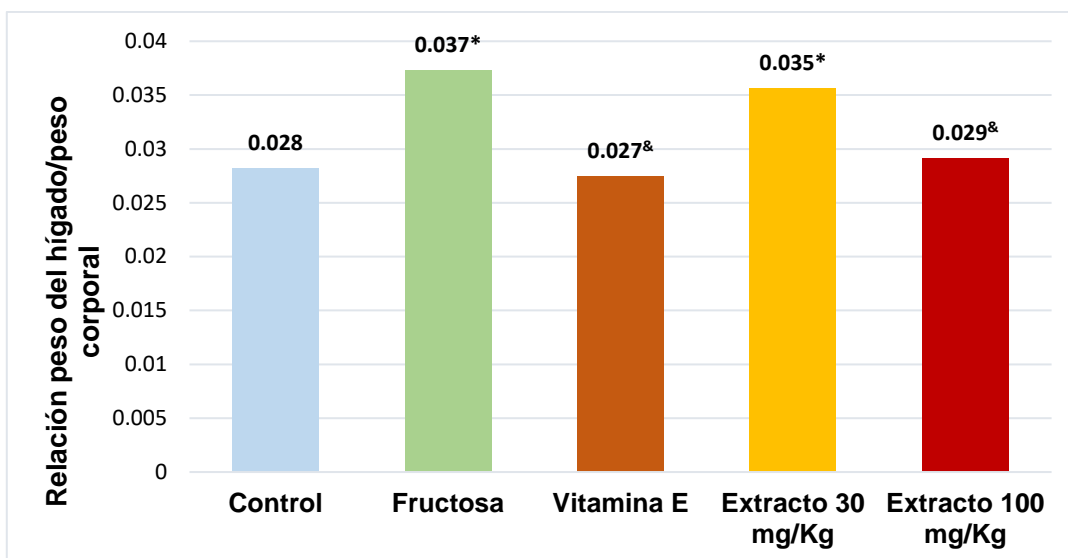


Figura 10. Relación peso hígado/ peso corporal. Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.

Al observar los pesos corporales, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. En el caso de los pesos de los hígados solo mostraron diferencias significativas los del grupo de fructosa con relación al grupo control (hígados más grandes) y el grupo de vitamina E presentó diferencias significativas en relación con el grupo de fructosa (hígados más pequeños y de pesos cercanos al grupo control).

Al observar la relación peso corporal/ peso del hígado el grupo de fructosa tiene la mayor proporción (hipertrofia) y tiene diferencias significativas con respecto al grupo control, el grupo tratado con la vitamina E tiene una proporción normal cercana al grupo control. La concentración de 30 mg/kg de extracto etanólico de *H. excelsa* no presentó mejorías en relación con el grupo de fructosa, en cambio la concentración de 100 mg/kg alcanzó un valor cercano al grupo control y mostró diferencias significativas en relación al grupo tratado con fructosa lo cual nos permite inferir un efecto hepatoprotector.

Para demostrar ese efecto se cuantificaron las aminotransferasas ALT y AST, las cuales son indicadoras de daño hepático en el organismo, los resultados se muestran en la figura 11.

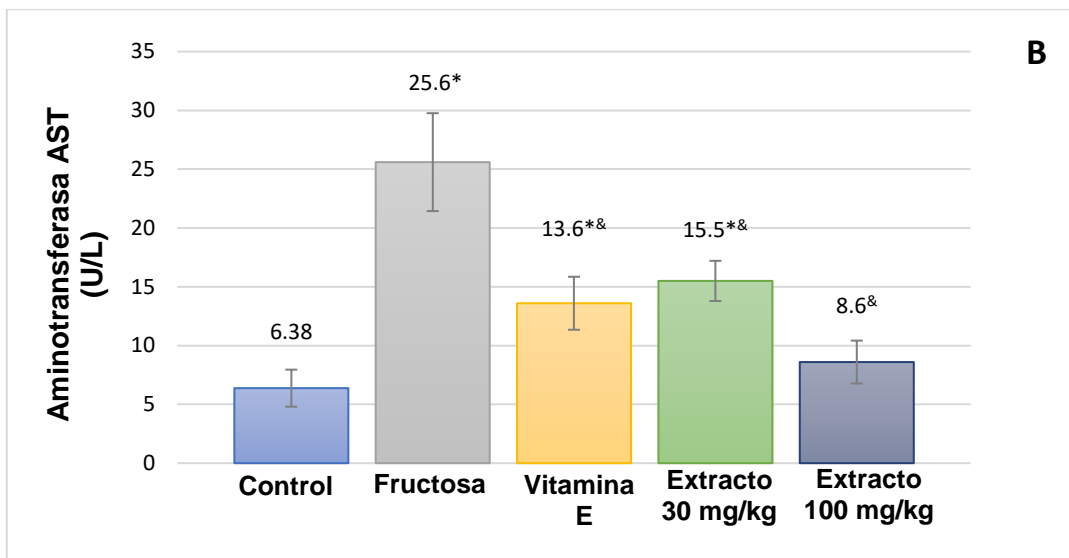
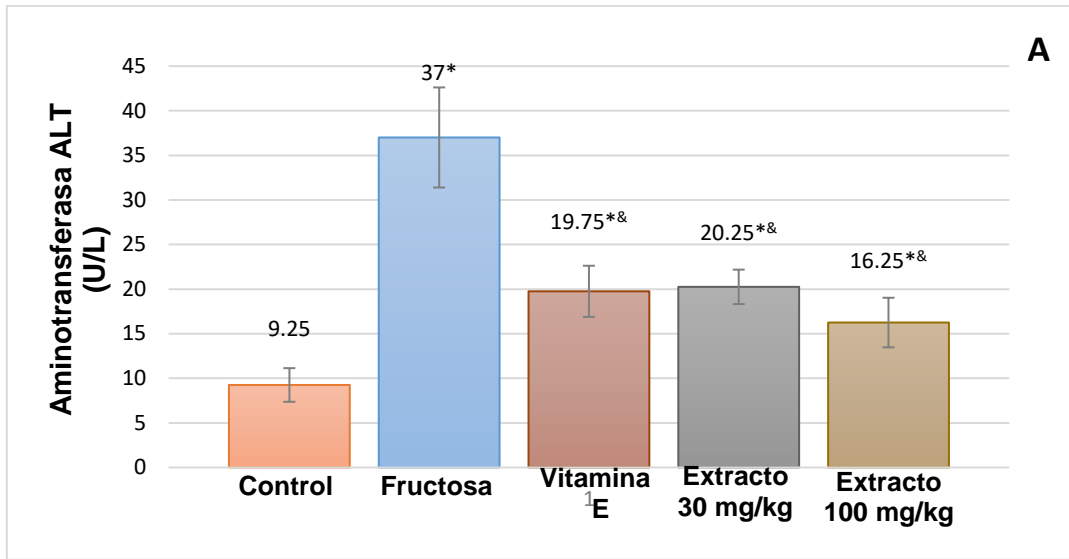


Figura 11. Concentración plasmática de aminotransferasas en respuesta a los diferentes tratamientos. A) Aminotransferasa ALT, B) Aminotransferasa AST; Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.

La relación peso corporal/ peso del hígado, del cual se había inferido un efecto hepatoprotector fue comprobado con la concentración de ALT y AST en plasma. El grupo de fructosa presenta daño hepático al tener una concentración de 37 U/L de ALT y de 25.6 U/L de AST, los valores máximos permitidos son de 22 U/L para ALT y de 19 U/L en el caso de la AST.

Los grupos experimentales de vitamina E y ambas concentraciones del extracto regresaron a valores normales para la aminotransferasa ALT, pero presentaron diferencias significativas en relación al grupo control. Para la aminotransferasa AST los tratamientos de vitamina E y la concentración de 30mg/kg regresaron a valores aceptables, pero presentaron diferencia significativa con el grupo control, en cambio la concentración de 100 mg/kg también obtuvo un valor aceptable y no mostró diferencia significativa con el grupo control, por lo cual se puede determinar que esta concentración tiene el mejor efecto hepatoprotector.

Determinación bioquímica del efecto antioxidante del extracto etanólico de *H. excelsa* en hígado de rata

Se cuantificaron las enzimas antioxidantes: catalasa (Figura 12), superóxido dismutasa (Figura 13) y glutatión peroxidasa en homogeneizados de hígado de rata en presencia de los diferentes tratamientos (Figura 14) con la finalidad de determinar si hubo un cambio en la producción de ellas provocando una alteración de la actividad antioxidante.

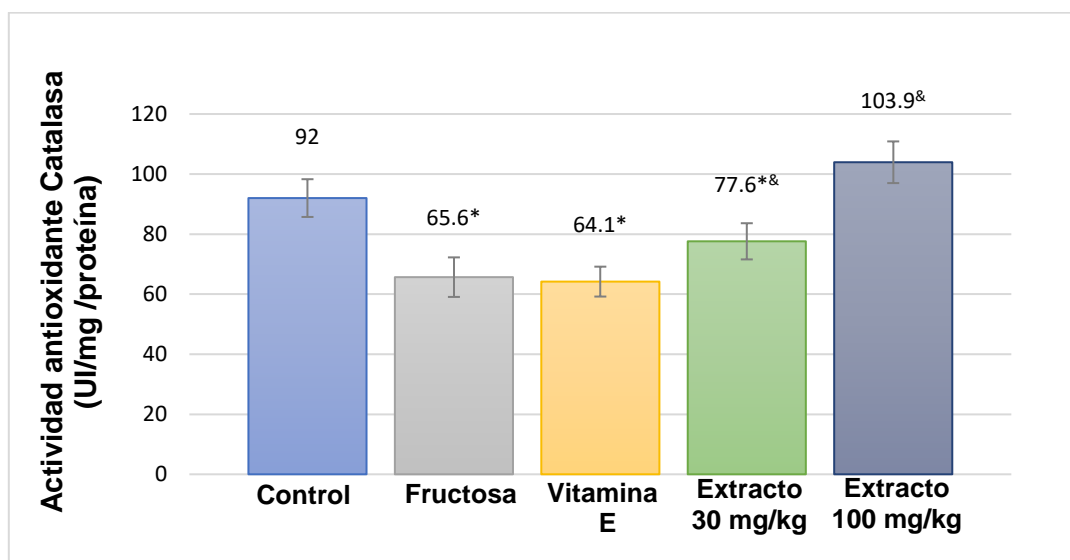


Figura 12. Actividad antioxidante de la enzima catalasa en el homogeneizado de hígado en presencia de los diferentes tratamientos; Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.

La enzima catalasa se encontró disminuida y presentó diferencias significativas con relación al grupo control en el tratamiento de la fructosa, vitamina E y la concentración de 30 mg/kg; aunque esta última tuvo mejoría con relación al grupo de fructosa. En la concentración de 100 mg/kg se puede observar una mayor producción de la enzima en relación al grupo control pues mejora la actividad antioxidante en el órgano hepático

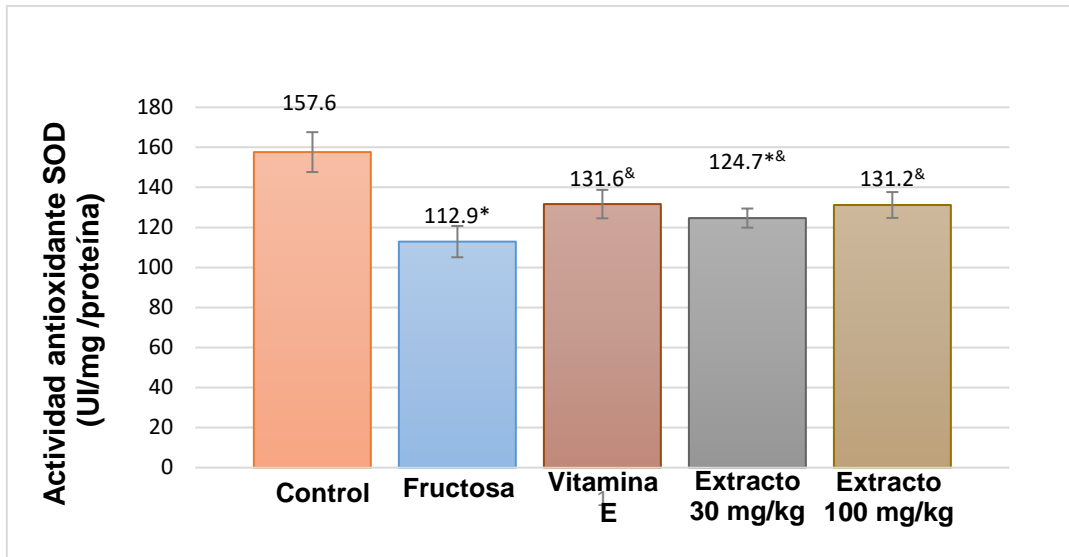


Figura 13. Actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en el homogeneizado de hígado en presencia de los diferentes tratamientos; Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.

Para el caso de la enzima superóxido dismutasa, los grupos experimentales mostraron una mejoría significativa en relación con el grupo solo tratado con fructosa, aunque no lograron alcanzar el valor obtenido del grupo control.

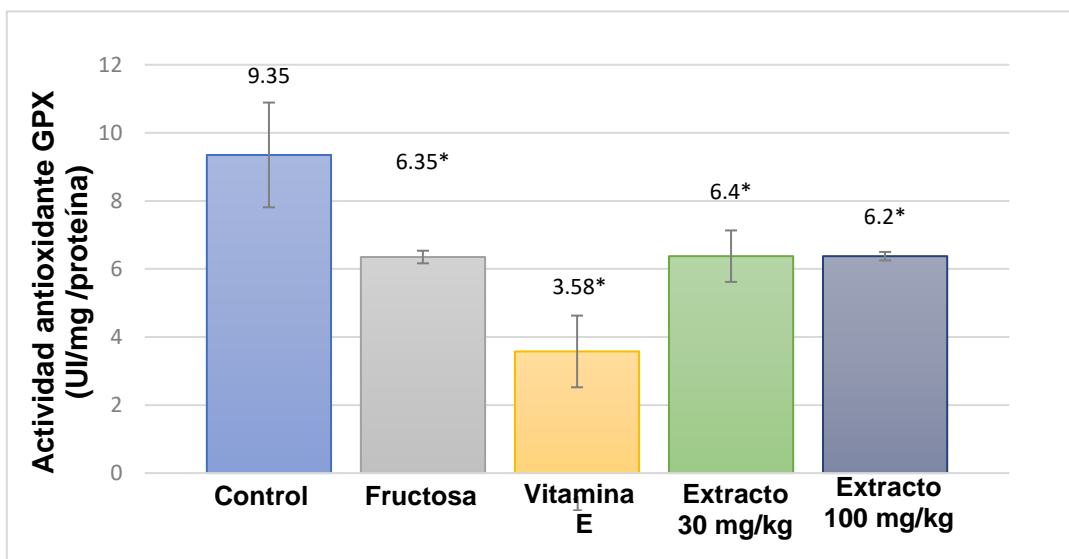


Figura 14. Actividad antioxidante de la enzima glutatión peroxidasa en el homogeneizado de hígado en presencia de los diferentes tratamientos; Cada punto representa la media \pm EEM de 5 ratas por grupo; * $P < 0.05$ control vs tratamientos; & $P < 0.05$ fructosa vs tratamientos.

Por último, la concentración de la enzima glutatión peroxidasa en los tratamientos experimentales no demostraron un aumento significativo en relación al grupo tratado con fructosa, por lo cual dicha actividad antioxidante se mantuvo en valores disminuidos con relación al grupo control.

Análisis Histológico

En los cortes histológicos de hígado de rata tomados después de seis semanas de tratamiento, las muestras del grupo control que se observan en la figura 15a mostraron un hígado normal ya que los hepatocitos no se encuentran afectados o modificados de alguna manera, en comparación el grupo tratado solo con fructosa, el cual presentó un hígado con pérdida de hepatocitos con un grado de inflamación considerable, lo que provocó modificación en la estructura celular, lo cual es evidente por la formación de espacios intersticiales en algunas regiones del tejido hepático (Figura 15b).

Por otra parte, el hígado del grupo tratado con vitamina E se observó similar al del grupo control (Figura 15c), las muestras de las concentraciones de 30 mg/kg y 100mg/kg del extracto etanólico de *H. excelsa* que se pueden apreciar en las figuras 15d y 15e respectivamente provocaron una proliferación de hepatocitos, lo cual restauró el hígado a condiciones normales muy parecidas al grupo control.

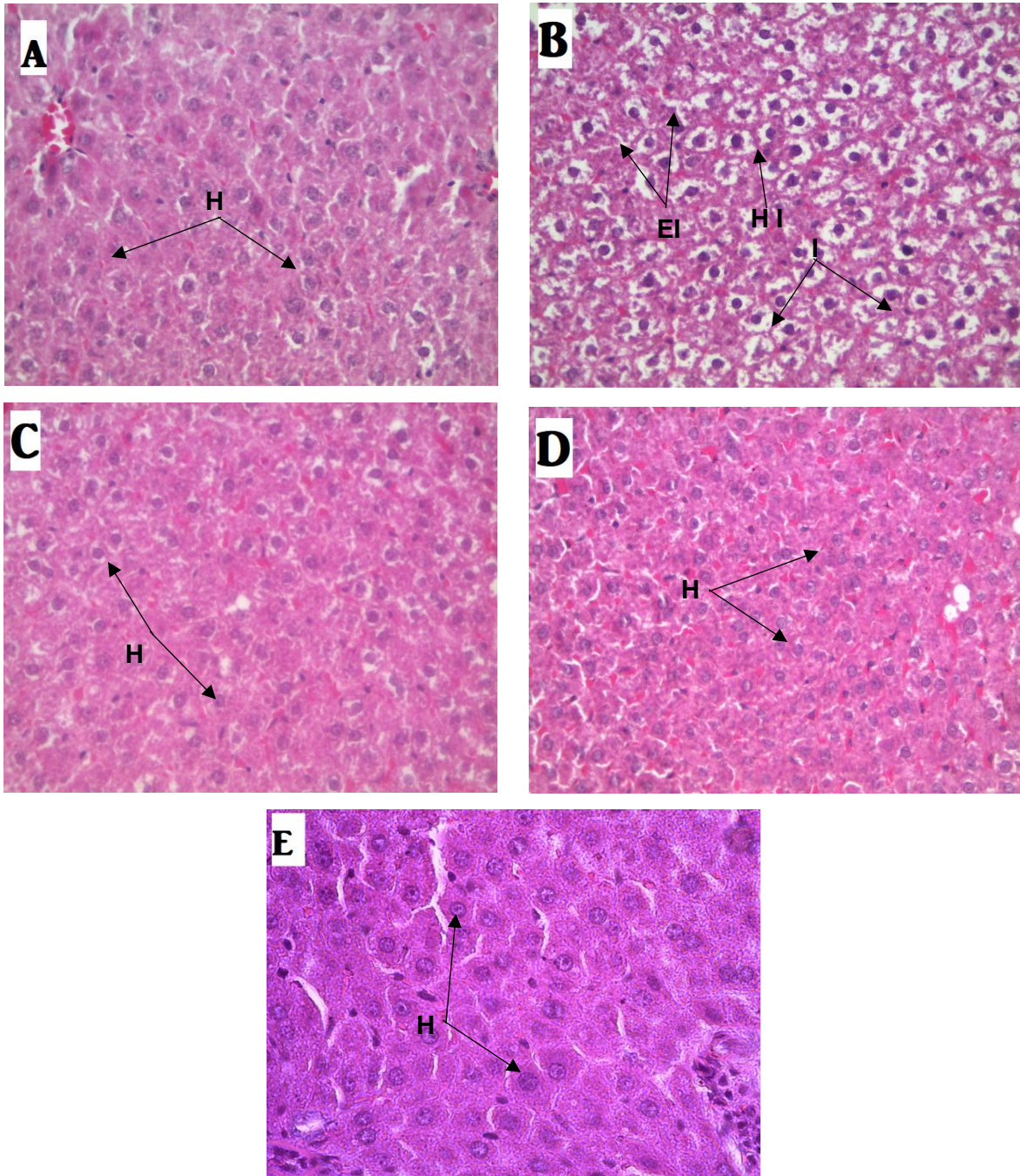


Figura 15. Cortes histológicos sagitales de tejido hepático a 400X, realizados con la técnica H&E. A) Control, B) Fructosa, C) Vitamina E, D) Extracto de *H. excelsa* 30 mg/kg y E) Extracto de *H. excelsa* 100mg/kg. Hepatocitos (H), hepatocitos inflamados (HI), inflamación (I) y espacios intersticiales (EI).

DISCUSIÓN

La cultura de la medicina tradicional es el conjunto de ideas, muy cercano a las creencias y modos de ver y de pensar; resultando en una cultura natural. Desde un enfoque etnobotánico nos adentramos en la naturaleza a través de las plantas, con la finalidad de encontrar tratamientos alternativos (Aparicio, 2005).

El extracto etanólico de *H. excelsa* presento saponinas, las cuales pertenecen al grupo de metabolitos constitutivos y éstas pueden ser moléculas del tipo glucosiladas, triterpenoides, esteroides o alcaloides esteroideos (Morrissey y Osbourn., 1999). Las saponinas tienen efectos de toxicidad para algunos microorganismos, insectos, animales y hongos (Díaz., 2009) las cuales pueden estar ligadas al efecto antiangiogénico (Mena *et al.*, 2007) y pesticida en general (Mata *et al.*, 1990).

También fueron positivas las pruebas para terpenos y triterpenos/esteroides, los cuales son metabolitos secundarios no nitrogenados relacionados a la actividad antioxidante que pueden proporcionar en las plantas y pueden tener un efecto tóxico contra insectos y microorganismos (Sepulveda *et al.*, 2003). *H. excelsa* se caracteriza por tener un alto contenido de terpenos y triterpenos principalmente en la parte de la raíz y la corteza de la planta (Cáceres *et al.*, 2008).

Por último, el extracto etanólico dio positivo a la prueba del cloruro férrico, lo cual no indica la presencia de compuestos fenólicos, pero las determinaciones de alcaloides, glicósidos y cumarinas resultaron ser negativas. Anteriormente esto no se había reportado en ningún trabajo relacionado a *H. excelsa*.

El HPLC-MS del extracto etanólico de *H. excelsa* logró identificar tres compuestos: la vainillina (<1%), genisteina (<1%) y el ácido oleanólico en un 51.49%; pero una molécula que fue no identificada tuvo una abundancia del 40.86%. Mena y colaboradores (2007) reportaron que el ácido oleanólico es un triterpeno, el cual está presente en la corteza y la raíz de *H. excelsa* en una elevada concentración, lo cual concuerda con lo reportado en este trabajo.

El ácido oleanólico presenta actividad hepatoprotectora, anti-hiperlipidemia, anti inflamatoria e hipoglicémica según el compendio de estudios que realizó Liu en 1995. En el presente trabajo el ácido oleanólico que se encuentra en el extracto etanólico de *H. excelsa* puede ser el compuesto activo que otorga la capacidad hepatoprotectora, anti-hiperlipídica y anti inflamatoria en el modelo animal de SM que se desarrolló.

Al cuantificar la presencia de compuestos fenólicos en el extracto etanólico de *H. excelsa* presentó una alta concentración de fenoles, ya que se obtuvieron 286.4mg EAG/g de extracto, lo cual es relevante debido a que se ha reportado que existe una relación directa entre la concentración de fenoles y la actividad antioxidante (Xu *et al.*, 2007), debido a que este grupo de metabolitos secundarios presentan la propiedad de poder donar o transferir un electrón de sus grupos hidroxilo aromáticos a un radical libre (López *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que los resultados de la actividad antioxidante del presente trabajo representan información que contribuye con el conocimiento de las propiedades medicinales de *H. excelsa*, ya que no se han reportado trabajos de actividad antioxidante *in vitro* de ninguna especie del género *Hippocratea* por lo cual los resultados obtenidos son los primeros en este sentido.

Los resultados de la actividad antioxidante sugieren que el extracto etanólico de *H. excelsa* puede considerarse un buen antioxidante, debido a que la CA₅₀ que reduce a los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] fueron de 21.73 µg/mL y 18.05 µg/mL respectivamente, y en cuanto al poder antioxidante de reducción férrica se obtuvo que el extracto posee 379.2 µg ET/g de extracto.

Lo mencionado puede afirmarse ya que La FDA (Food and Drug Administration, USA) considera que un compuesto o mezcla es un buen antioxidante si presenta valores de CA_{50} por debajo de los 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gardziella *et al.*, 2000).

Por otra parte, la implementación del modelo animal del SM mediante la administración de una dieta con un 20% de fructosa añadida en agua y alimento fue exitosa; se ha estudiado anteriormente que el incremento del consumo de la fructosa en la sociedad va en aumento y contribuye al desarrollo de las patologías del SM y su relación con la esteatosis no alcohólica (Bray *et al.*, 2004). Al tiempo cero se tomaron los parámetros bioquímicos en sangre obtenida de la cola de cada rata, los cuales se encontraron dentro de los valores normales (Tabla 4).

Posteriormente se dio paso a la administración de la dieta con fructosa añadida. Durante esa etapa se observó un incremento en la ingesta del agua y alimento conforme transcurrió el tiempo, el cual es producido por la adicción que puede generar el consumo del monosacárido en elevadas cantidades, incrementando el peso corporal y el índice de masa corporal en el organismo (Nakagawa *et al.*, 2005).

Al término de las 12 semanas de la administración de la dieta de fructosa se volvieron a tomar los mismos parámetros que al tiempo cero para diagnosticar la presencia de SM (Tabla 5), los animales presentaron obesidad al tener un valor mayor a 0.3 de índice de Lee, el cual considera el peso corporal del animal y la longitud hocico-anal (Suarez *et al.*, 2013), hipertensión arterial y trigliciridemia; las cuales están estrechamente relacionadas con la obesidad según el trabajo realizado por Panchal y colaboradores, quienes en el 2011 mencionan que la ingesta de una dieta alta en concentraciones de fructosa ocasiona afectaciones cardiovasculares y la bioquímica sanguínea se altera.

En la caracterización del modelo de SM en ratas macho Wistar, elaborado por Mamikutty y colaboradores (2014) mencionaron el aumento en la ingesta de agua y alimento, incremento en la circunferencia abdominal, aumento en el peso corporal, hipertensión arterial y trigliceridemia con una dieta concentrada del 20% de fructosa

añadida. Al igual que el presente trabajo se lograron obtener esas patologías con la misma concentración de fructosa añadida.

Al tener tres de los cinco factores de riesgo se diagnosticó el SM, estos resultados concuerdan con lo reportado por Merino y colaboradores (2014), ellos elaboraron de igual manera un modelo animal experimental con fructosa añadida y después de las 12 semanas encontraron aumento de peso e índice de Lee elevado, trigliceridemia y ellos añadieron un aumento en la concentración de la aminotransferasa ALT en plasma sanguíneo.

No se lograron obtener niveles elevados de glucosa y colesterol en plasma sanguíneo en el modelo animal desarrollado en el presente estudio porque la concentración de fructosa añadida fue baja (20% extra añadido) esto comparado con los trabajos de Prakash y cols (2014); Merino y colaboradores (2014) reportaron que la concentración mínima de fructosa añadida debe ser del 35% hasta un 60% para obtener valores por encima del rango permitido; aunque también enfatizan que hay insulino-resistencia en puntos locales del organismo al ingerir niveles bajos de fructosa en la dieta.

Después de que se diagnosticó el SM, se dio paso a la aplicación de los tratamientos durante las seis semanas anteriormente mencionadas. Al terminar la fase experimental y tomar de nueva cuenta los parámetros del SM (tabla 6) se observó un efecto antiobesidad mediante la disminución del índice de Lee y el peso final de los organismos experimentales a valores normales en los tratamientos de las concentraciones de 30mg/kg y 100mg/kg del extracto etanólico de *H. excelsa*, en comparación con lo reportado por Younis y colaboradores (2017) del extracto de *Asphodelus tenuifolius* el cual fue administrado en una dosis de 500 mg/kg en ratas Wistar con SM, no logró tener diferencias significativas en cuanto al peso final y no presentó algún efecto antiobesidad.

La hipertensión arterial al ser una de las complicaciones más sencillas de adquirir en un modelo de SM inducido por fructosa y de la cual se desprenden diferentes patologías cardiovasculares provoca un alto riesgo de mortalidad. Actualmente se

están buscando tratamientos alternativos con efectos hipotensores para prevenirla (El-Bassossy *et al.*, 2014). En el presente trabajo, con la administración del extracto etanólico de *H. excelsa* en los grupos experimentales se logró tener un efecto hipotensor, al disminuir la presión arterial sistólica y mantenerla en el rango aceptable no mayor a 140 mmHg.

El grupo experimental al que se le administró vitamina E también mostró un efecto antiobesidad e hipotensor, restaurando a niveles normales el índice de Lee y la presión arterial; comparado con la investigación de Wallinger y colaboradores (2011), en la cual también demostraron mejoría en dichas patologías del SM y añaden que el uso prolongado de la vitamina E puede ser una alternativa de tratamiento para el SM.

La hiper-trigliceridemia diagnosticada a las 12 semanas no se logró disminuir al término de la aplicación de los tratamientos (figura 7), esto debido a la ingesta diaria de fructosa la cual provoca que los niveles de triglicéridos continúen en valores elevados, aunque en su composición pueden variar la proporción de lipoproteínas de baja y alta densidad (Delzeene *et al.*, 2002).

Se elaboró un perfil lipídico para observar las proporciones de LDL y HDL en cada tratamiento (figura 8). El grupo de fructosa mostró una elevación de LDL y una disminución de HDL, en cambio ambas concentraciones del extracto etanólico de *H. excelsa* restauraron la concentración de LDL a un rango aceptable y aunque no pudieron mejorar la concentración de HDL si presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento de la fructosa, por lo que se infiere un efecto hepatoprotector. Al compararse con lo reportado por Al-Rasheed y colaboradores, en el 2014, el extracto etanólico de *H. excelsa* presenta mejores resultados que los extractos de *Nigella sativa* y *Allium sativum* ya que ambos no muestran diferencias significativas en el perfil lipídico y están considerados como tratamientos alternativos para el SM.

Para comprobar el efecto hepatoprotector, se necesitó de la relación peso del hígado/peso corporal y los niveles de las aminotransferasas ALT y AST. El grupo

tratado con fructosa desarrollo hipertrofia del hígado en comparación con el grupo control y los niveles de ALT y AST rebasaron los niveles permitidos respectivamente; esto representa un daño hepático considerable y puede llegar a producirse la EHGNA según lo reportado por Senaphan y colaboradores (2017), detallaron que al ingerir fructosa en una cantidad más elevada a la normal los niveles de ALT, AST y triglicéridos se ven alterados, esto se comprueba en el presente trabajo.

La concentración de 30 mg/kg del extracto etanólico de *H. excelsa* no fue capaz de disminuir la hipertrofia provocada por el consumo de fructosa, pero si restauró los niveles de ambas aminotransferasas a valores aceptables, en cambio la concentración de 100 mg/kg del extracto evitó la hipertrofia del órgano. En comparación con la silimarina la cual está reportada como tratamiento alternativo para atenuar patologías hepáticas, se necesitó de una concentración de 300 mg/kg para producir un efecto que disminuyera la hipertrofia y no logró mostrar diferencias significativas en los niveles de ALT y AST (Prakash *et al.*, 2014).

En otro estudio que reportó Merino y colaboradores en el 2014, evaluaron el efecto del extracto de *Psacalium decompositum*, logró disminuir los niveles de las dos aminotransferasas, pero no mencionaron si puede prevenir la hipertrofia hepática. Por lo anteriormente mencionado es posible atribuir un efecto hepatoprotector al extracto etanólico de *H. excelsa*.

El tratamiento con la vitamina E presentó un efecto hepatoprotector al reducir la hipertrofia y mantuvo en concentraciones normales los niveles de ALT y AST; corroborando el estudio que elaboró Faure y colaboradores en 1997, reportan un efecto benéfico a nivel local en el hígado y a nivel sistémico en las concentraciones de triglicéridos en el plasma sanguíneo con la administración de vitamina E en animales alimentados con alta dosis de fructosa.

Las enzimas antioxidantes son el producto evolutivo devenido con la necesidad de la asimilación del oxígeno por parte de los organismos eucariontes, las más importantes que participan en la defensa antioxidante son la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (Benítez, 2006). Existen evidencias que sugieren la participación del estrés oxidativo crónico y la disminución de estas enzimas en la progresión de la EHGNA y fibrosis, por lo cual es importante evaluar la actividad antioxidante (Loza, 2003).

Se han reportado estudios que informan una sobreproducción de EROs y radicales libres en ratas alimentadas con una dieta elevada en fructosa y una disminución de la actividad antioxidante de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Aidyn *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). Esta disminución se observa en el presente trabajo.

El extracto etanólico de *H. excelsa* tiene la capacidad para contrarrestar y alcanzar niveles normales de la actividad antioxidante enzimática comparado con los trabajos de Ajiboye y cols, quienes en el 2015 y 2017 mencionaron que los extractos de *Hunteria umbrellata* e *Hibiscus sabdariffa* atenúan el estrés oxidativo y restauran la actividad enzimática siendo una alternativa de tratamiento para disminuir las patologías del SM. Mencionado lo anterior el extracto etanólico de *H. excelsa* puede ser considerado como antioxidante y una alternativa para el SM.

Los resultados que se reportan en el presente estudio sobre el efecto antioxidante bioquímico en un modelo de SM inducido por fructosa no tienen antecedente alguno. El tratamiento con la administración de la vitamina E no mostró mejoría alguna en los niveles de las tres enzimas antioxidantes en comparación con el grupo tratado únicamente con fructosa.

Los tratamientos con la vitamina E y las dos concentraciones del extracto etanólico de *H. excelsa* (Figura 15 C, D, E) respectivamente, lograron contrarrestar los efectos producidos por la ingesta de la dieta alta en fructosa sobre la ultraestructura hepática (Figura 15 B).

Este efecto se debe a la actividad antioxidante *in vivo* que presentaron los tratamientos al restaurar los niveles de las enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Loza (2003), demuestra que la actividad antioxidante de las enzimas anteriormente mencionadas se encuentra disminuida drásticamente en la EHGNA y que un tratamiento alternativo para esta patología puede ser la administración de extractos herbales para restaurar dicha actividad antioxidante.

Los resultados histológicos que se presentan en este trabajo bajo los diferentes tratamientos demuestran un efecto hepatoprotector del extracto etanólico de *H. excelsa* y la vitamina E al restaurar el tejido hepático y la producción de hepatocitos; en comparación con el reporte de Ugaz y cols (2012), ellos evaluaron el efecto hepatoprotector del extracto de *Gentianella alborosea* en un modelo de EHGNA inducida por dieta elevada en fructosa, obteniendo resultados negativos y sin poder atribuirle algún efecto hepatoprotector al extracto evaluado. Por lo anteriormente mencionado podemos aseverar que el uso de *H. excelsa* puede ser considerada un tratamiento alternativo para la EHGNA.

CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *H. excelsa* presenta saponinas, terpenos, fenoles y triterpenos.
- El extracto etanólico de *H. excelsa* presento actividad antioxidante *in vitro* frente a los radicales DPPH•, ABTS•+ y en la reducción férrica.
- El extracto etanólico de *H. excelsa* tuvo un efecto anti obesidad, hipotensor arterial e hipotrigliceridémico en el modelo de SM inducido por fructosa.
- El extracto etanólico de *H. excelsa* logró disminuir la concentración de lipoproteínas y aminotransferasas en el organismo a valores aceptables.
- El extracto etanólico de *H. excelsa* mostro actividad antioxidante *in vivo* al proliferar la actividad de las enzimas: catalasa, superoxido dismutasa y glutatión peroxidasa en homogenizados de hígado.
- El análisis histológico demostró la actividad antioxidante *in vivo* del extracto etanólico de *H. excelsa* restaurando el tejido hepático.
- Los resultados permiten considerar al extracto etanólico de *H. excelsa* como una alternativa para el tratamiento del síndrome metabólico y la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

REFERENCIAS

Aebi, H.E. 1983. Ozidoreductases acting on groups other than CHOH. 3.9 Catalase: hydrogen-peroxidase: hydrogen-peroxidase oxidoreductase E.C. 1. 11. 1. 6. En, Bergmeyer HU. Ed. Methods of Enzymatic Analysis. Vol. III. Weinheim. Verlag chemie. 273-286 pp.

Ajiboye, T. O., Hussaini, A. A., Nafiu, B. Y., y Ibitoye, O. B. 2017. Aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (K. Schum.) Hallier f.(Apocynaceae) palliates hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 198:184-193.

Ajiboye, T. O., Raji, H. O., Adeleye, A. O., Adigun, N. S., Giwa, O. B., Ojewuyi, O. B., y Oladiji, A. T. 2015. *Hibiscus sabdariffa* calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress in fructose-induced metabolic syndrome rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 1522-1531.

Akhlaghi, M. 2016. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Beneficial Effects of Flavonoids. *Phytotherapy Research*, 30(10): 1559-1571.

Al-Rasheed, N., Al-Rasheed, N., Bassiouni, Y., Faddah, L., y Mohamad, A. M. 2014. Potential protective effects of *Nigella sativa* and *Allium sativum* against fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of oleo science*, 63(8): 839-848.

Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., y Catak, Z. 2014. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*, 30:1, 1-9.

Barraza, E. W. y Stalnikowitz, K. D. 2016. ESTEATOSIS Y ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 1-10.

Beauchamp, C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287.

Benito, F. G., Montero, I. J. F., y del Río Ligorit, A. 2005. Prevención y tratamiento del síndrome metabólico. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 5:4. 46D-52D.

Benítez Zequeira, D. E. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 25:2.

Bermúdez Toledo, D., Boffill Cárdenas, M., Betancourt Morgado, E., Escobar Román, R., Igualada Correa, I. y Alonso Cárdenas, B. 2014. Evaluación preclínica de la actividad hepatoprotectora de *Ocimum basilicum* L. y *Allium sativum* L. *Medical Sur*, 12(1): 51-62.

Bray, G. A., Nielsen, S. J. y Popkin, B. M. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 79(4): 537-543.

Brea, Á., Pintó, X., Ascaso, J. F., Blasco, M., Díaz, Á., González-Santos, P. y Pedro-Botet, J. 2017. Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (I). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y su asociación con la enfermedad cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 29(3): 141-148.

Buqué, X., Aspichueta, P. y Ochoa, B. 2008. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Española de enfermedades digestivas*, 100(9): 565-578.

Cáceres-Castillo, D., Mena-Rejón, G. J., Cedillo-Rivera, R. y Quijano, L. 2008. 21 β -Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry*, 69(4): 1057-1064.

Ceballos, L. T., Angelín, B. P. y García, C. R. 2008. Uso de estatinas durante la infancia. *Anales de Pediatría* 68(4): 385-392.

Crespo Herrera, S. 2009. Metformina, a 50 años de su uso: Eficacia, tolerancia, seguridad y nuevas indicaciones. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12(2): 23-25.

Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M. y Taper, H. S. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *British Journal of Nutrition*, 87(S2): S255-S259.

Díaz Puentes, L. N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1:2.

Domínguez, X. A., Balick, M. J., Cicció, J. F., Joel, D. M., Marbach, I., Mayer, A. M., y Hilton, J. J. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica, México.

El-Bassossy, H. M., Dsokey, N. y Fahmy, A. 2014. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. *Toxicology mechanisms and methods*, 24(8): 536-543.

El Ferrol, A. M. y Coruña, A. 2006. El paciente con exceso de peso: guía práctica de actuación en Atención Primaria. *Revista Española de Obesidad*, 4(1): 33-44.

Errico, T. L., Chen, X., Campos, J. M. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C. y Blanco-Vaca, F. 2013. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25(2): 98-103.

Fadlalla, E. y Khojah, E. 2017. Effect of Aqueous Extract of Tamarindus indica L. Seeds and Crocus sativus on Fructose-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(1): 10-10.

Faure, P., Rossini, E., Lafond, J. L., Richard, M. J., Favier, A. y Halimi, S. 1997. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *The Journal of nutrition*, 127(1): 103-107.

Fernández-Travieso, J. C. 2016. Síndrome Metabólico y Riesgo Cardiovascular. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47:2.

García, D. L. 1996. Inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina. *Acta Medicina Colombiana*, 21(5): 289.

Hernández-Ávila, M., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gómez-Acosta, L. M. y Gaona-Pineda, E. M. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Hernández Tamayo, M., Miguel Soca, P., Marrero Hidalgo, M., Pérez López, L., Peña Pérez, I., y Rivas Estévez, M. 2011. Comportamiento de variables clínicas, antropométricas y de laboratorio en pacientes con síndrome metabólico. *Medisur*, 9(2): 102-109.

Jiménez A. 2011. Herbolaría mexicana. Editorial del colegio de postgraduados. México pp. 194

Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology*, 49(2): 57-68.

Lopez-Velez, M., Martinez-Martinez, F., y Valle-Ribes, C. D. 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(3): 233-244.

Loza, R. A. C. 2003. La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. *Medicina UNAB*, 6:16.

Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R. y Haji Suhaimi, F. 2014. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed research international*, (2014).

Martín-Domínguez, V., González-Casas, R., Mendoza-Jiménez-Ridruejo, J., García-Buey, L. y Moreno-Otero, R. 2013. Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 105(7): 409-420.

Mata, R., Calzada, F., Díaz, E., y Toscano, R. A. 1990. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XV. Sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *Journal of natural products*, 53(5): 1212-1219.

Meckes M., David-Rivero A.D., Nava-Aguilar V., Jimenez A. 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Unidad de investigación médica en farmacología de productos naturales. México*. 446-451.

Medina, C., Pretel, O., Urquiaga, T., Torres, P. y Villanueva, C. 2017. Efecto hepatoprotector de *vaccinium floribundum* hbk “pushgay” (Ericaceae) frente al estrés oxidativo inducido con tetracloruro de carbono. *The biologist*, 13(2).

Mena-Rejón, G. J., Pérez-Espadas, A. R., Moo-Puc, R. E., Cedillo-Rivera, R., Bazzocchi, I. L., Jiménez-Díaz, I. A., y Quijano, L. 2007. Antigiardial Activity of Triterpenoids from Root Bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of natural products*, 70(5): 863-865.

Merino-Aguilar, H., Arrieta-Baez, D., Jiménez-Estrada, M., Magos-Guerrero, G., Hernández-Bautista, R. J., Susunaga-Notario, A. D. C y Alarcón-Aguilar, F. J. 2014. Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Nutrients*, 6(2): 591-604.

Morrissey, J. P. y Osbourn, A. E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3): 708-724.

Murillo, F, E. 2006. Actividad antioxidante *in vitro* de las bebidas de frutas. Alfa editores técnicos. 20-27 pp.

Nakagawa, T., Tuttle, K. R., Short, R. A. y Johnson, R. J. 2005. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nature clinical practice Nephrology*, 1(2): 80-86.

Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L., y Reyes-Trejo, L. 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3): 383-388.

Otani, H. 2011. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxidants & redox signaling*, 15(7): 1911-1926.

Paglia, E.D., y Valentine, N.W. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of laboratory and clinical medicine* 70, 158-168.

Panchal, S. K., Poudyal, H., Iyer, A., Nazer, R., Alam, A., Diwan, V. y Gobe, G. 2011. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 57(1): 51-64.

Prakash, P., Singh, V., Jain, M., Rana, M., Khanna, V., Barthwal, M. K., y Dikshit, M. 2014. Silymarin ameliorates fructose induced insulin resistance syndrome by reducing de novo hepatic lipogenesis in the rat. *European journal of pharmacology*, 727, 15-28.

Perez, R. M., Perez, S., Zavala, M. A., y Salazar, M. 1995. Anti-inflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 47:2 85-90.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. A. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26, 1231-1237.

Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., y Trujillo López, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista cubana de medicina militar*, 30(1): 15-20.

Rossi, A., Oliva, M. E., Chicco, A., y Ferreira, M. R. 2011. La semilla de Salba (*Salvia hispánica* L.) dietaria previene la esteatosis hepática y dislipidemia inducida en ratas normales por una dieta rica en sacarosa. *FABICIB*, 15(1): 47-59.

Rovira, L. C., Montserrat, P. T., Llorens, M. A. A., y Blanco, G. P. 2008. Esteatosis hepática no alcohólica. Puesta al día. Atención primaria, 40(8): 419-424.

Senaphan, K., Kukongviriyapan, U., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V., y Pannangpetch, P. 2017. A Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by a High-Carbohydrate, High-Fat Diet with Fructose in Drinking Water. Asia-Pacific Journal of Science and Technology, 22(2): 76-88.

Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., y Rocha Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 21:3.

Singleton, V. y Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16: 144-153

Suárez Román, G., Perera Calderín, A., Clapés Hernández, S., Fernández Romero, T., & Egaña Morales, E. (2013). Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. MediSur, 11(5): 569-573.

Troncoso, L., y Guija, E. 2007. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. Anales de la Facultad de Medicina 68(4): 333-343.

Ugaz-Soto, L., Zafra-Tanaka, J. H. y Tapia Vicente, M. E. 2012. Efecto de Gentianella alborosea en esteatosis hepática no alcohólica inducida por dieta hiperlipídica en ratas holtzman hembras. Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana, 17:1.

Venereo Gutiérrez, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de medicina militar, 31(2): 126-133.

Wallinger, M. L., Rosón, M., Ricci, C., Linares, L. M. y Reyes Toso, C. F. 2011. Administración de dosis elevadas de vitamina E en ratas adultas con síndrome metabólico experimental: efecto sobre el estrés oxidativo. Diaeta, 29(135): 27-34.

Xu, B. J., y Chang, S. K. C. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. Journal of food science, 72:2.

Younis, W., Schini-Kerth, V. B., Junior, A. G., y Majid, M. 2017. Cardioprotective effect of *Asphodelus tenuifolius* Cav. on blood pressure and metabolic alterations in glucose-induced metabolic syndrome rats-an ethnopharmacological approach. *Journal of ethnopharmacology*, 214: 168-178.

Zhang, H. F., Shi, L. J., Song, G. Y., Cai, Z. G., Wang, C., y An, R. J. 2013. Protective effects of matrine against progression of high-fructose diet-induced steatohepatitis by enhancing antioxidant and anti-inflammatory defences involving Nrf2 translocation. *Food and chemical toxicology*, 55: 70-77.

Zhao, X., Ho, D., Gao, S., Hong, C., Vatner, D. E., y Vatner, S, F. 2011. Arterial pressure monitoring in mice. *Curr protoc mouse biol.* 1:105-22.

Zimmet, P., Alberti, M. M., George, K., y Serrano Ríos, M. 2005. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Revista española de cardiología*, 58(12): 1371-1376.

ANEXOS

A) Método de maceración.

El método de maceración consistió en colocar la corteza seca y fragmentada en un matraz y se le adicionó la cantidad de solvente apropiada la cual depende del extracto que se quiere obtener. En el presente trabajo se utilizó etanol (C_2H_5OH) al 70%. Se dejó en reposo durante 72 horas. Posteriormente el extracto se filtró y el exceso de solvente se destiló a presión reducida en un rotavapor (Domínguez, 1973).

B) Reacción de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Se determinó la cantidad de fenoles totales observando el cambio de color del reactivo Folin-Ciocalteu de amarillo, que en presencia de un fenol se tornó al azul. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico a partir de una solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.1 y 0.12 mg/mL) para un volumen final de 1mL (se añadió agua), en el caso del extracto se preparó una solución estándar de la muestra con una concentración de 0.02 mg/mL. Se transfirieron 300 μ L de cada una de las concentraciones (ácido gálico y sustancia a evaluar) a tubos con 1800 μ L de agua destilada, posteriormente se adicionaron 150 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu a cada tubo.

Después de cinco minutos de incubación, se añadieron 450 μ L de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen final de 3000 μ L. Los tubos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente y cada concentración se determinó por triplicado. Terminado el tiempo de reacción se leyó la absorbancia a 760nm, finalmente a los datos obtenidos de la curva patrón y el extracto se les aplicó un análisis de regresión lineal y la absorbancia de la muestra experimental se interpoló. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco.

C) Reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolin-6 sulfonato de amonio [ABTS^{•+}]) (Método modificado de Re *et al.*, 1999).

Se evaluó la cuantificación de la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+} el cual es un cromóforo color verde-azulado estable que absorbe a una longitud de onda de 734nm. El radical ABTS^{•+} se produjo utilizando una mezcla de reacción la cual contuvo solución de ABTS^{•+} (7mM/7/L) y solución de persulfato de potasio (2.45 Mm/L) en agua destilada. La solución de trabajo se preparó mezclando las dos soluciones stock en cantidades iguales y se dejó 16 horas a temperatura ambiente en obscuridad. Se elaboró la disolución del ABTS^{•+} mezclando 1mL de solución ABTS^{•+} con 60 mL de metanol para obtener una absorbancia de 0.7 a 734nm. 300 µL de la muestra de del extracto a las concentraciones (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 µg/mL) y del estándar de referencia el cual fue Trolox preparado con metanol al 80% a las concentraciones (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 µg/mL), se hicieron reaccionar con 2700 µL de la solución ABTS^{•+} en tubos de ensaye. Posteriormente se permitió la reacción en la obscuridad durante 7 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se leyó la absorbancia de las mezclas de reacción a 734nm. El porcentaje de reducción del radical ABTS^{•+} se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{Ac - Am}{Ac} \times 100$$

Ac= media aritmética de la absorbancia control.

Am= la media aritmética de la absorbancia de la muestra

D) Reacción del radical 2,2-difenil-picril-hidracilo () (Método modificado de Murillo, 2006)**

Esta reacción de óxido-reducción del radical DPPH• el cual se reduce al aceptar un electrón de la sustancia antioxidante, se pudo observar por el cambio de color de violeta intenso a amarillo. Se utilizó como control positivo quercetina a las concentraciones de: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 µg/mL. En el caso del extracto se ocuparon las concentraciones de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/mL. En una placa de 96 pozos se añadieron por triplicado 50µL de los compuestos problemas posteriormente se adicionaron 150 µL de la solución metanólica del DPPH•, la placa se incubó en la oscuridad y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37°C; una vez transcurrido el tiempo la placa se midió a 515nm en un lector de ELISA. Por último, se determinó el porcentaje de decoloración del DPPH• correspondiente al porcentaje de reducción con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = \left(\frac{C - E}{C} \right) * 100$$

Dónde: C= Absorbancia del control DPPH•; E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH• + compuesto problema)

Poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) la cual determina la capacidad antioxidante de manera indirecta.

E) Poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) (Método modificado de Benzie y Strain, 1996).

En esta reacción el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) el cual es incoloro fue reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se midió la absorbancia del Fe⁺². De tal manera que cuanto más antioxidante sea la sustancia mayor fue la reducción y aumentó la concentración de Fe⁺² y se presentó una más alta la señal de la absorbancia.

Para este ensayo se prepararon las siguientes soluciones:

- a) 300mM de amortiguador de acetato pH 3.6 (Acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial).
- b) 10mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) en 40mM de HCl.
- c) 20mM FeCl₃.

Las soluciones descritas se mezclaron en una relación a:b:c 10:1:1 (v/v/v) para obtener la mezcla de reactivos FRAP, la cual se mantuvo durante todo el proceso en un baño a 37°C. En tubos de ensaye se adicionaron 286 µL de las muestras de referencia las cuales fueron: trolox a las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL para la elaboración de la curva patrón y del extracto 0.1mg/mL; y 2714 µL de reactivo FRAP para obtener un volumen final de 3000 µL. Los tubos de ensaye se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se leyeron a una absorbancia de 593nm. La absorbancia final de la muestra se comparó con la curva patrón de trolox. Los resultados se expresaron como µg equivalentes de trolox por gramo de muestra fresca.

F) Catalasa (Método de Aebi H. 1983)

La catalasa consume el peróxido de hidrógeno y forma en su lugar agua y oxígeno. Esto se observó como la disminución de la absorbancia de una muestra a 240nm, contra el tiempo. Se determinó la absorbancia en intervalos de 15 segundos, a partir de la adición de la muestra.

El espectrofotómetro se ajustó a cero con el amortiguador de fosfatos 66.6mM, pH 7.0, posteriormente se agregó a una cubeta de cuarzo 1 mL de peróxido de hidrógeno, más 10 µL de la muestra y se registró la absorbancia cada 15 segundos a partir de la adición de la muestra. Se calculó la desaparición del peróxido de hidrógeno utilizando el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno: $\epsilon = 40/M \text{ cm}$ a 240nm. Se corrige por concentración de proteínas en la muestra y se reportó como UI/mg proteína. Una UI equivale a 1.0 µmol de peróxido de hidrógeno consumido por minuto.

G) Glutación peroxidasa (Método de Paglia y Valentine, 1967).

La reacción se lleva a cabo cuando el glutatión peroxidasa consume glutatión y como cofactor oxida NADPH, esta reacción se acopla con la reacción de la glutatión reductasa la cual genera el cofactor. La reacción se vuelve cíclica, y la diferencia en la absorbancia a 340nm entre los 2 y 4 minutos de reacción es proporcional a la actividad del glutatión peroxidasa presente.

Alternativamente, se puede mezclar previamente el amortiguador, el NADPH, el glutatión reductasa, la azida de sodio y el GSH, y de esta mezcla agregar 2.8 mL a la cubeta, después de mezclar la muestra con el reactivo de Drabkin.

La reacción se inició con 100 μ L de peróxido de hidrógeno, se registró la absorbancia al inicio a los dos y cuatro minutos. Se obtuvo la diferencia entre las lecturas a los dos y los cuatro minutos y se definió una UI como la desaparición de 1 μ mol de NADPH por minuto por miligramo de proteína.

H) Superóxido dismutasa (Método de Beauchamp y Fridovich, 1971).

La xantina oxidasa reduce el nitroazul de tetrazolio, transfiriendo electrones desde el ión superóxido a la xantina. La adición de superóxido dismutasa o extracto biológico donde se encuentra la actividad enzimática inhibirá la transferencia y disminuirá la reducción de nitroazul de tetrazolio, en medio alcalino.

Para llevar a cabo la reacción se necesitó la mezcla con la concentración de xantina que a una absorbancia de 560nm se acerque a 0.15 y para elaborar la curva de la muestra experimental se añadieron a los tubos de ensaye 2 mL de la mezcla de reacción y de la muestra experimental 2 μ L más el volumen de la xantina. Al final se obtuvieron las unidades McCord-Fridovich las cuales son las cantidades de proteína que inhibe en un 50% la reducción de NBT.

I) Técnica de Hematoxilina – Eosina.

DESPARAFINAR.

1. Xilol – 5 minutos
2. Xilol – 5 minutos.

HIDRATAR

3. Alcohol etílico absoluto – 3 minutos
4. Alcohol etílico al 96 % – 3 minutos
5. Alcohol etílico al 90 % – 3 minutos
6. Alcohol etílico al 80 % – 3 minutos
7. Alcohol etílico al 70 % – 3 minutos
8. Agua corriente – 3 minutos

TINCIÓN NUCLEAR

9. Hematoxilina de Harris – 7 minutos
10. Agua corriente – lavar (hasta quitar el exceso de colorante)

DIFERENCIAR

11. Alcohol ácido al 1% - paso rápido
12. Agua corriente – lavar

VIRAR

13. Agua amoniacal – hasta virar a azul
14. Agua corriente – lavar

TINCIÓN CITOPLÁSMICA

15. EOSINA – 5 minutos

DESHIDRATAR

16. Alcohol etílico al 96% - 30 segundos
17. Alcohol etílico absoluto – 3 minutos
18. Alcohol etílico absoluto – 5 minutos
19. Xilol – 5 minutos
20. Xilol – 5 minutos
21. Montar con resina